

**WIRKUNG UND WIRKUNGSMECHANISMUS
ÖDEMPROTEKTIVER SUBSTANZEN
AM MODELL DER VENA AURICULARIS
DES SCHWEINES UND AN DEM
DER KATZENEXTREMITÄT**

Ingrid Hönig

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0030

Aus dem Walther–Straub–Institut für Pharmakologie
und Toxikologie der Ludwig–Maximilians–Universität,
München

WIRKUNG UND WIRKUNGSMECHANISMUS ÖDEMPROTEKTIVER
SUBSTANZEN AM MODELL DER VENA AURICULARIS
DES SCHWEINES UND AN DEM DER KATZENEXTREMITÄT

Inaugural–Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereiches für Biologie der
Ludwig–Maximilians–Universität München

vorgelegt von

Ingrid Hönig
aus München

München 1989

Erstgutachter: Prof. Dr. H. Cleve

Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Ziegelmayer

Sondergutachter: Prof. Dr. W. Felix

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 1989

DISSERTATIONS-UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	2
2.1.	Chronische Veneninsuffizienz	2
2.2.	Morphologie und Funktion des venösen Abschnittes des Kreislaufsystems	3
2.2.1.	Bau und Funktion der Kapillaren	3
2.2.2.	Bau und Funktion der großen Venen	4
2.3.	Ursachen und Folgen der chronischen Veneninsuffizienz	7
2.3.1.	Chronische venöse Abflußstörungen	7
2.3.2.	Idiopathische Veneninsuffizienz	8
2.4.	Therapie der chronischen Veneninsuffizienz	10
2.4.1.	Venotonika	10
2.4.2.	Diuretika	10
2.4.3.	Ödemprotektive Pharmaka	11
2.5.	Chemie, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, und Wirkungsmechanismus von TMHC, Ruscus-Extrakt, HR und Aescin	11
2.5.1.	Chemie	11
2.5.2.	Pharmakokinetik	17
2.5.3.	Pharmakodynamik	19
2.5.3.1.	Klinische Studien	19
2.5.3.2.	Tierexperimentelle Studien	20
2.5.3.2.1.	Entzündliches Ödem	21

2.5.3.2.2.	Stauungsödem	22
2.5.3.2.3.	Lymphödem	23
2.5.3.2.4.	Strahleninduziertes Ödem	23
2.5.3.2.5.	Ödem durch Hitze	23
2.5.3.2.6.	Ödem durch kapillarschädigende Substanzen	24
2.5.4.	Mögliche Wirkungsmechanismen	24
2.5.4.1.	Wirkung auf Entzündungsmediatoren	24
2.5.4.2.	Wirkung auf Basallamina	26
2.5.4.3.	Wirkung auf Membranen allgemein	26
2.5.4.4.	Wirkung auf Makrophagen, Proteolysesteigerung	26
2.6	Problemstellung der Arbeit	27
3.	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1.	MATERIAL	29
3.1.1.	Lösungen	29
3.1.2.	Pharmaka	30
3.1.3.	Geräte	30
3.2.	METHODEN	32
3.2.1.	Etacrynsäureödem an der isolierten Ohrrendvene des Schweines	32
3.2.1.1.	Versuchsverlauf	33
3.2.2.	Etacrynsäureödem am Hinterlauf der Katze	35
3.2.2.1.	Narkose	35
3.2.2.2.	Präparation	36

3.2.2.3.	Strömungskonstante Perfusion	37
3.2.2.4.	Isovolumetrische Zustand	39
3.2.2.5.	Versuchsverlauf	40
3.2.3.	Bestimmung des Protein- und Flüssigkeitsgehaltes der Muskel- und Hautproben bzw. der Venen	43
3.2.3.1.	Proteinbestimmung	43
3.2.3.2.	Flüssigkeitsbestimmung	46
3.2.3.3.	Statistische Auswertung	47
3.2.4.	Dünnschichtchromatographie	49
4.	ERGEBNISSE	
4.1.	Zur Wirkung von TMHC, Ruscus-Extrakt, HR und Aescin auf das Etacrynsäureödem an der isolierten Ohrtrandvene (Vena auricularis) des Schweines	51
4.1.1.	Kontrollversuche	52
4.1.1.1.	Erstellung eines Ödemmodells	52
4.1.1.2.	Zum Mechanismus der Etacrynsäure	56
4.1.2.	Verumversuche	60
4.1.2.1.	TMHC	61
4.1.2.1.1.	Ödemprotektive Wirkung	61
4.1.2.2.	Ruscus-Extrakt	65
4.1.2.2.1.	Ödemprotektive Wirkung	65
4.1.2.2.2.	Zum Wirkungsmechanismus	65
4.1.2.3.	HR	71
4.1.2.3.1.	Ödemprotektive Wirkung	71
4.1.2.3.2.	Zum Wirkungsmechanismus	74

4.1.2.4.	Aescin	80
4.1.2.4.1.	Ödemprotektive Wirkung	80
4.1.2.4.2.	Zum Wirkungsmechanismus	84
4.1.3.	Dünnschichtchromatographie von TMHC, HR, Ruscus- Extrakt und Aescin	86
4.2.	Zur Wirkung von Aescin auf das Etacrynsäureödem am Hinterlauf der Katze	99
4.2.1.	Protein-und Flüssigkeitsgehalt des Ödems	99
4.2.1.1.	Kontrollversuche	99
4.2.1.2.	Verumversuche	102
4.2.2.	Dynamik der Ödementstehung	106
4.2.2.1.	Kontrollversuche	107
4.2.2.2.	Verumversuche	110
4.2.3.	Arterieller Perfusionsdruck	112
4.2.3.1.	Kontrollversuche	112
4.2.3.2.	Verumversuche	112
4.2.4.	Systemischer Blutdruck	114
4.2.4.1.	Kontrollversuche	114
4.2.4.2.	Verumversuche	116

5.	DISKUSSION	117
5.1.	Etacrynsäureödem an der isolierten Ohrrendvene des Schweines als in-vitro-Modell zur Untersuchung ödem- protektiver Substanzen	117
5.2.	Zum Wirkungsmechanismus der Etacrynsäure	120
5.3.	Zum Wirkungsmechanismus von TMHC, Ruscus-Extrakt, HR und Aescin an der isolierten Ohrrendvene des Schweines	122
5.4.	Zur Wirkung von Aescin an der Katzenextremität – Ver- gleiche mit seinem in-vitro Effekt	125
6.	LITERATUR	131
7.	DANKSAGUNG	148
8.	LEBENS LAUF	149

1. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird an der isolierten Ohrrendvene des Schweines ein Modell für das Gefäßwandödem erstellt. Durch 2.5 minütige Verabreichung von 0.1 %iger Etacrynsäure wurde die Permeabilität sowohl für Proteine, als auch für niedermolekulare Flüssigkeit erhöht.

Unsere Versuche deuten darauf hin, daß Proteine in die ungeschädigte Venenwand filtrierte werden und Etacrynsäure diesen Prozeß verstärkt. TMHC (0.005 %), Ruscus-Extrakt (0.005 %) und HR (0.05 %) reduzieren das Ödem, wenn sie gleichzeitig mit Etacrynsäure appliziert werden, und zwar TMHC höchstwahrscheinlich dadurch, daß es das Endothel abdichtet und Ruscus-Extrakt und HR durch Stabilisierung von Membranstrukturen der Venenwand.

Aescin vermindert an der isolierten Ohrrendvene – unabhängig vom Gesamtorganismus – in keiner der verabreichten Konzentrationen (0.0025%, 0.01%, 0.1%) das Ödem; hingegen wirkte es in einer Konzentration von 0.1 % sogar permeabilitätssteigernd.

Ob Aescin, oral verabreicht, in-vivo überhaupt ödemprotektiv wirkt, wird am perfundierten Hinterlauf der Katze studiert, an dem wir durch intravasale Applikation von Etacrynsäure ein interstitielles Ödem auslösten (Methode: Felix, 1983). Die beste Schutzwirkung wurde durch Aescin erzielt, wenn es 5 Tage lang in einer Dosierung von 5 mg/Tier und Tag verabreicht wird. In dieser Dosierung reduzierte es die vermehrte Durchlässigkeit für Proteine im Muskel, welche 45 Minuten nach Ödemerzeugung gemessen wurde, als auch das "akute Wasserödem" signifikant, das während der Perfusion mit Etacrynsäure entstand. Darüberhinaus verhinderte die 5-tägige Applikation von 5 mg Aescin/Tier und Tag das Ansteigen des Arteriolentonus im Anschluß an die Schädigungsphase und ließ den Blutdruck gegenüber den Kontrollkatzen signifikant steigen.

2. EINLEITUNG

2.1. Chronische Veneninsuffizienz

In der sogenannten Tübinger Studie (Fischer, 1981) wurde ermittelt, daß 72 % der Frauen und 54 % der Männer der BRD über Schmerzen in Füßen, Gelenken oder Beinen klagten. Aus derselben Untersuchung geht hervor, daß diese Beschwerden bei einem Achtel der Erwachsenen von einer leichten oder beginnenden chronischen Veneninsuffizienz herrühren und 1 Million Menschen als Folge dieser Krankheit an einem Geschwür im Bein (Ulcus cruris) leiden.

Was versteht man unter chronischer Veneninsuffizienz (CVI) ? Nach van der Molen, der diesen Begriff prägte, entsteht eine chronische venöse Insuffizienz immer dann, wenn der venöse Abfluß nicht mehr im vollem Umfang gewährleistet ist. Als Hauptsymptom stellt sich dann ein Ödem ein. Weitere Merkmale wie Gefäßveränderungen (z.B. sekundäre Varizen), aber auch entzündlich-ekzematöse Prozesse in der Haut bis hin zum bereits erwähnten Ulcus cruris können darüberhinaus das Bild der CVI bestimmen.

Die progredient verlaufenden venösen Abflußstörungen stellen nicht nur besonders für ältere Menschen eine Beeinträchtigung ihrer Lebensqualität dar, sondern verursachen auch für die gesamte Bevölkerung erhebliche Kosten. Aus diesem Grunde erweist sich eine gezielte Therapie als äußerst notwendig.

Bevor ich schildere, wie diese nach dem heutigen Stand des Wissens aussehen kann, möchte ich anhand der Physiologie des venösen Abschnittes des Kreislaufsystems auf die einzelnen Entwicklungsbedingungen näher eingehen, die schließlich zu dem Krankheitsbild der chronischen Veneninsuffizienz führen.

2.2. Morphologie und Funktion des venösen Abschnittes des Kreislaufsystems

2.2.1. Bau und Funktion der Kapillaren

Bau der Kapillaren

Der venöse Ast des Gefäßbaumes beginnt mit der venösen Seite der Kapillaren. Diese bilden zusammen mit den Arteriolen und Venulen die Endstrombahn, wo der Stoffaustausch zwischen Blutgefäßen und Gewebe stattfindet. Die Struktur der Kapillaren, die ja nur ein Endothel aufweisen, richtet sich nach der Funktion des jeweiligen Organs. Die Ausprägung des Endothelschlauches reicht von lückenlos (Hirn) bis stark fenestriert (Leber). In den unteren Extremitäten besteht etwa 0.1 % der Kapillaroberfläche aus Poren.

Funktion der Kapillaren

Die Funktion der Kapillaren besteht nun darin, den Stoffwechselaustausch zwischen Gefäßsystem und anliegendem Gewebe herzustellen.

So wird auf der arteriellen Seite der Kapillaren Flüssigkeit aus den Gefäßen ins Gewebe filtriert, auf der venösen Seite vom Gewebe in die Gefäße reabsorbiert.

Dies geschieht vorwiegend mittels interendothelialer Fugen im Endothel der Kapillaren. Durch sie gelangt vor allem niedermolekulare Flüssigkeit hindurch, während Makromoleküle, wie zum Beispiel die Proteine, diese Spalten nur bedingt passieren können.

Der Durchtritt von niedermolekularer Flüssigkeit durch das als semipermeable Membran aufzufassende Endothel hängt vom hydrostatischen Druck in den Kapillaren und im Interstitium ab, sowie von dem, durch die Makromoleküle, die das Endothel nicht durchdringen können, verursachten kolloidosmotischen (onkotischen) Druck im Interstitium bzw. in der Endstrombahn. Dabei filtriert ein hoher hydrostatischer Druck im Gefäßsystem die Flüssigkeit ins Interstitium, während ein hoher kolloidosmotischer Druck

im Gefäßsystem niedermolekulare Flüssigkeit aus dem Interstitium ansaugt (Starling'sches Schema).

Während der kolloidosmotische Druck im Gefäßsystem und im Interstitium sowie der hydrostatische Druck im Interstitium jeweils auf der arteriellen und venösen Seite gleich sind, liegt der arterielle hydrostatische Druck höher als der venöse. Dies bewirkt, daß Flüssigkeit am arteriellen Schenkel der Kapillaren ins Gewebe filtriert, auf deren venösen Seite, vorallem aber an den Venulen, aus dem Interstitium in die Gefäße reabsorbiert wird.

2 2.2. Bau und Funktion der großen Venen

Bau der großen Venen

Im Gegensatz zu den Kapillaren bestehen die großen Venen aus 3 Schichten: der Intima, der Media (Muscularis) und der Adventitia.

1) Intima.

Die Vene weist innen ein lückenloses Endothel auf. Haftstrukturen verbinden dessen Zellen untereinander. Diese enthalten nur wenig Organellen, stattdessen charakteristische Faserelemente, die erheblichen mechanischen Kräften standhalten und deshalb in größerer Zahl im Endothel der Venenklappen vorkommen. An die Endothelzelle grenzt die Basallamina (Basalmembran), die durch kollagene Fasern an die Media gekoppelt ist. Möglicherweise besteht auch über den "Inhalt der interendothelialen Fugen" (Hammersen, Fischer, Bräuer, 1985) eine Verbindung von der Basallamina mit der Glykokalyx der luminalen Oberfläche (Hammersen, Fischer, Bräuer, 1985).

Elektronenmikroskopisch gesehen besteht die Basallamina aus 2 elektrophellen Zonen, den laminae rarae, und der dazwischenliegenden elektro-

nendichten Zone, der lamina densa.

Chemisch gesehen weisen alle 3 Schichten einen hohen Gehalt an Glykoproteinen auf. Die Lamina densa ist darüberhinaus reich an nicht filamentär organisierten Kollagens (Typ IV) und enthält wie die lumenwärts folgende Lamina rara (sive lucida) vor allem Glykosaminoglykane (Hammersen, Fischer, Bräuer, 1985).

Durch ihr hohes Wasserbindungsvermögen können diese Mucopolysaccharide unterschiedlich stark hydratisiert sein und bestimmen so wesentlich die Sol-Gel-Eigenschaften dieser Schicht (Hammersen, Fischer, Bräuer, 1985).

Verankert wird die Basallamina durch zarte Mikrofibrillen in der sog. Lamina reticularis des interstitiellen Raumes, der in Richtung Media auf die Basalmembran folgt (Hammersen, Fischer, Bräuer, 1985).

Neben dieser Befestigungsfunktion besteht – wegen ihrer siebartigen Struktur – eine wesentliche Rolle der Basallamina im transluminalen Stoffeinstrom, wobei die Sieblöcher den Transport sowohl von niedermolekularen Materialien, Elektrolyten und Wasser, als auch von hochmolekularen Substanzen ermöglichen. (Hammersen, Fischer, Bräuer, 1985). Sie werden in die Gefäßwand filtriert.

Andererseits wird diskutiert, daß die Versorgung der Venenwand mit hochmolekularen Substanzen wie Proteinen mittels Pinozytose durch die Endothelzellen erfolgt.

2) Media (Muscularis)

Sie besteht neben glatten Muskelfasern aus kollagenen und elastischen Fasern. Das Gefüge ist nicht so straff wie das der Arterien und ermöglicht in einem weiten Bereich Querschnittsänderungen (Felix, 1986)

3) Adventitia

Die Adventitia ist relativ dick und verbindet das Gefäß mit dem Interstitium.

Neben den Mediazellen enthält sie kollagene, elastische und Muskelfasernzüge.

Die Muskelfasern verlaufen im wesentlichen wie eine " Schraube mit sehr niedriger Ganghöhe " (Hammersen, Fischer, Bräuer, 1985). In den großen oberflächlichen Venen der unteren Extremitäten stabilisieren außerdem noch kräftige, longitudinal verlaufende Muskelfasern die Venenwand gegenüber den hämostatischen Druck (Hammersen, Fischer, Bräuer, 1985).

Die elastischen Fasern sind mitsamt ihren Spalträumen längsorientiert. Das kollagene Fasergerüst zeigt einen scherengitterähnlichen Aufbau und erweist sich in Ruhe als kräuselig, spiralig; bei zunehmenden Beanspruchungen kann es jedoch bis zu einem gewissen Maß passiv gedehnt werden. (Hammersen, Fischer, Bräuer, 1985)

Funktion der großen Venen

Die Aufgabe der großen Venen ist es, das Blut bis zu einem gewissen Grad zu speichern (kapazitative Venen) und es zum Herzen zurückzuleiten. Zur Speicherung des Blutes sind die Venen sehr dehnungsfähig und können sich gut weiten. Durch ihren beträchtlichen Umfang setzen die großen Venen dem Blutstrom einen geringen Widerstand entgegen (niedriger Venendruck) und unterstützen so den Flüssigkeitsaustausch in den Kapillaren.

Die Rückführung des Blutes aus den Kapillaren zum Herzen, die z.B. im Beinbereich entgegen dem orthostatischen Druck erfolgt, wird erleichtert durch die Venenklappen, die so einen retrograden Rückstrom des Blutes in die Peripherie verhindern. Doch speziell in den Beinen reichen die Venenklappen für einen geregelten Abfluß des Blutes nicht aus — sie würden, wenn die betreffende Person steht, bei stetigem Blutstrom nicht schließen und die Blutsäule würde auf dem Gewebe lasten — "mit allen Folgen" für dessen Wassergehalt (Felix, 1986). Aus diesem Grund ist die Gelenk — Muskelpumpe wichtig, welche folgendermaßen funktioniert: die oberflächlichen (epifaszialen) Venen der Haut führen über die Vv. perforantes — bei intakten Klappen — den tiefen (subfaszialen) Venen das Blut zu. Diese werden

bei jeder Kontraktion der Beinmuskeln in Verbindung mit der Bewegung des oberen Sprunggelenkes komprimiert und ihr Blut wird – entsprechend der Klappenrichtung – zum Herzen gepumpt (Felix, 1986)

2.3. Ursachen und Folgen der chronischen Veneninsuffizienz

2.3.1. Chronisch venöse Abflußstörungen

Interstitielles Ödem

Dieses feingeregelter System des Blutaustausches mit dem Gewebe und die Mechanismen des Blutrücklaufes zum Herzen können nun erheblich gestört werden. So vermag der Abfluß des Blutes aus dem Bein durch mechanische Hindernisse in der Strombahn, bedingt durch Thromben oder Schwangerschaft beeinträchtigt werden (Felix, 1986). In ihrem Gefolge kommt es dann oft dazu, daß die Klappen mit der Venenwand verwachsen, und so nicht mehr schließen, was wiederum zu einer Erweiterung der Venen (sekundäre Varizen) und damit zu einer Beeinträchtigung der Muskelpumpe und des Blutrücklaufes zum Herzen führt.

Einer Erweiterung der Venen entspricht auch eine angeborene Klappenaplasie- oder hypoplasie (Fischer, 1984).

All dies führt dazu, daß der Blutfluß verlangsamt wird oder zum Erliegen kommt, was dann die verschiedenen Ödemformen bedingt, welche das hervorstechendste Merkmal der chronischen Veneninsuffizienz darstellen. So steigt der Druck in den großen Venen wie auch im Kapillargebiet, was – wie schon oben erwähnt – aus rein hämodynamischen Gründen bewirkt, daß mehr Wasser in die Gewebe filtrierte, als aus diesen abgeführt wird. Der Wassergehalt des Gewebes ist dann erhöht, Es ist ein sogenanntes hämodynamisches Ödem (Felix, 1978 a) entstanden, welches eiweißarm ist.

Werden die anfallenden Stoffwechselprodukte, wie Gase (CO_2), Säuren und andere organische Verbindungen einschließlich großmolekulare Pro-

teine nicht mehr abtransportiert, so kann es vorkommen, daß das Endothel der Kapillaren im Laufe der Zeit Schaden nimmt und die interendothelialen Spalten sich öffnen (Hammersen, Fischer, Bräuer, 1985). In diesem Fall treten dann auch hochmolekulare Stoffe aus der Endstrombahn ins Gewebe und es entsteht ein eiweißreiches, "morphologisches" Ödem (Felix, 1978a). Werden die Eiweißkörper aus dem Interstitium durch die Lymphe nicht mehr abgeführt, so bildet sich ein "lymphatisches Ödem". Auch ein "entzündliches Ödem" kann sich im Gefolge von venösen Abflußstörungen entwickeln, wenn es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommt.

Gefäßwandödem

Weiterhin ist anzunehmen, daß neben diesem Ödem im Interstitium (interstitielles Ödem) auch ein Ödem in der Gefäßwand von großen Venen entsteht (Gefäßwandödem) (Felix, 1986). Dabei kann es sich im Anfangszustand um ein Ödem aus nur niedrigmolekularen Flüssigkeiten oder um ein eiweißreiches, "morphologisches", mitunter um ein entzündliches Gefäßwandödem handeln.

2.3.2. Idiopathische Veneninsuffizienz

Während bei dem eben geschilderten Krankheitsbild der chronischen Veneninsuffizienz die Veränderungen im Endothel der Kapillaren bzw. Venen als Folge von Abflußstörungen verschiedener Ursachen auftraten, können bei familiärer erblicher Veranlagung, altersbedingt oder durch hormonelle Einflüsse eine Erschlaffung der Venen die Ursache für venöse Abflußstörungen sein (idiopathische Veneninsuffizienz). Ein Umbau der Venen- und Kapillarwand kann nämlich wiederum zu primären Varizen, verschlußunfähigen Klappen, damit zu einem sistierenden Blutfluß und auch zu den verschiedenen Ödemformen führen.

In jüngster Zeit hat man diesen Umbau der Wand größerer Venen, der bei allen venösen Abflußstörungen auftritt, mit lysosomalen, die Proteoglykanmatrix der Venenwand abbauenden Enzymen in Verbindung gebracht. Man

vermutet, daß Lysosomen von Myozyten und Mastzellen, bei pH-Verschiebungen nach sauer, wenn ihre Hüllmembranen undicht oder sogar aufgelöst werden, ihren enzymreichen Inhalt in die Venenwand entlassen (Hammer-
sen, Fischer, Bräuer, 1985).

Einen Beweis hierfür liefert unter anderem der Vergleich der relativen Aktivitäten von 3 lysosomalen, Proteoglykan-abbauenden Enzymen im Serum gesunder Testpersonen und bei Patienten mit starker Varikosis. Dabei liegen die relativen Enzymaktivitäten von β -N-Azetylglucosaminidase, β -Glucuronidase, Arylsulphatase der varikösen Patienten signifikant, und zwar um die Hälfte höher als die der gesunden Probanden (Hammer-
sen, Fischer, Bräuer, 1985).

Neben dem Ödem können sich bei chronischer und idiopathischer Veneninsuffizienz auch Varizen und — wenn das Gewebe "versumpft" (Fischer, 1984) — Gefäß- und Hautveränderungen einstellen.

So zeigen Patienten oft infolge mangelnder O_2 -Versorgung eine Blaufärbung des Beines (Cyanose). Die Überfüllung der Venen macht sich häufig bemerkbar durch knopfförmige Erhabenheiten, besenreiserartige Venektasien und bläulichrote Stauungsflecken (Corona phlebectatica). Manchmal kommt es auch zu einer Fibrosierung des Koriums (Hypodermatitis) und auf dem Boden dieser Atrophie des Epithelverbandes zu einem Austrocknungsektzem oder zur Depigmentierung der Knöchelgegend mit eingestreuten weinroten Hyperplasien und randwärtige Hyperpigmentation (Atrophie blanche). Das für den Kranken schwerwiegendste Folgesymptom der CVI stellt das Ulcus cruris venosum dar, das spätestens dann entsteht, wenn die Stoffwechselschlacken derart überhandnehmen, daß der lymphatische Abfluß nicht mehr gewährleistet ist und auch nervale Elemente degenerieren.

2.4. Therapie der chronischen Veneninsuffizienz

Die meisten Maßnahmen, venöse Abflußstörungen zu lindern, setzen an ihren Hauptsymptomen, nämlich der Ödeme und der überdehnten bzw. varikösen Venen an. Die medikamentöse Therapie reicht für leichte Fälle aus, bei fortgeschrittenen Leiden kann sie die physikalischen (z.B. Kompressionsstrümpfe) bzw. chirurgischen Maßnahmen unterstützen. (Felix, 1986).

An Pharmaka stehen die Venotonika, die Diuretika und die ödemprotektiven Substanzen zur Verfügung.

2.4.1. Venotonika

Mit der Venentonisierung möchte man erweiterte Venen wieder verschlußfähig machen. Damit verfolgt man zwei Ziele. Erstens wird der venöse Abstrom erhöht, zweitens nimmt gleichzeitig das Stromzeitvolumen zu und die Zähflüssigkeit des Blutes ab, was wiederum bewirkt, daß die Gefahr einer Thrombose stark vermindert wird (Felix, 1986).

Das Venotonikum soll nun selektiv die Venen tonisieren und nicht allgemein sympathomimetische Effekte auslösen und damit zu einem oft unerwünschten Blutdruckanstieg führen. Diesen Anspruch erfüllt das Dihydroergotamin am ehesten.

2.4.2. Diuretika

Um ödemausschwemmende Substanzen handelt es sich bei den Diuretika. Wie schon ihr Name besagt, verstärken sie zunächst den Harnfluß. Die vermehrte Ausscheidung niedrigmolekularer Flüssigkeit über die Nieren bewirkt dann, daß die Konzentration an Plasmaproteinen steigt. Diese saugen darauf vermehrt Wasser aus dem Interstitium an, und zwar so lange, bis ein neues Gleichgewicht zwischen intra- und extravasalem Raum erreicht ist. Dies erfolgt im gesunden Gewebe schneller als im ödematösen, so daß durch so einen systemischen Effekt ein lokales Ödem ausgeschwemmt werden kann. Sind jedoch die Kapillaren im Zuge der CVI für Proteine durch-

lässig geworden, so wird ein durch Diurese erhöhter kolloidosmotischer Druck im Plasma auch durch Übertritt von Eiweiß in das Gewebe ausgeglichen und die ödemausschwemmende Wirkung der Diuretika bleibt aus. Aus dem genannten Grunde sollte die Behandlung von venösen Abflußstörungen mittels Diuretika nicht chronisch erfolgen. (Felix, 1986).

2.4.3 Ödemprotektive Pharmaka

Ein Ödem zu verhindern, bzw. zu verzögern, helfen die sogenannten ödemprotektiven Pharmaka, die vorwiegend aus Pflanzen gewonnen werden. Man weiß sie schon seit altersher als "Venenmittel" zu schätzen, doch ihr genauer Wirkungsmechanismus ist bis heute nicht endgültig geklärt. Chemisch gesehen stellen die ödemprotektiven Pharmaka fast ausnahmslos Glykoside dar und gehören zu den Gruppen der Flavonoide (z.B. O- β -Hydroxyaethylrutoside (HR) und Trimethylhesperidinchalkon (TMHC), der Steroidglykoside (z.B. Ruscus-Extrakt), der Triterpenglykoside (z.B. Roßkastanienextrakt, Aescin), und zu den synthetischen Glykosiden (z.B. Tribenosid, Clobenosid).

2.5. Chemie, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Wirkungsmechanismus der ödemprotektiven Pharmaka TMHC, Ruscus-Extrakt, HR und Aescin

Da in der vorliegenden Arbeit die ödemprotektiven Pharmaka Ruscus-Extrakt, TMHC, Aescin und HR untersucht werden sollen, möchte ich im folgendem auf deren Chemie, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und möglichen Wirkungsmechanismus eingehen.

2.5.1. Chemie

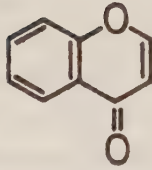
Trimethylhesperidinchalkon (TMHC)

TMHC zählt zu den Flavonoiden. Als Flavonoide im engeren Sinn be-

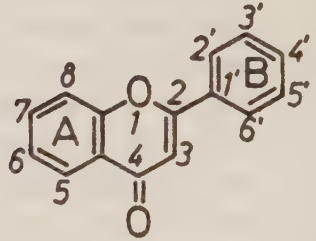
zeichnet man Glykoside, deren Genuin sich vom Flavon, dem 2-Phenylbenzo- γ -pyron ableitet. (s. Abb. 1) Doch rechnet man auch Abkömmlinge von Flavanen, Chalkone und ähnliche Verbindungen dazu.



Formel 1
 γ -Pyron



Formel 2
Benzo- γ -pyron
(Chromon)



Formel 3
Flavon

Abb.1 : Strukturformeln von γ -Pyron (1), Benzo- γ -Pyron (2) und Flavon (3)

Das Grundgerüst des TMHC stellt das Hesperidin dar, ein Derivat des Flavanons, das aus Citrusfrüchten gewonnen wird.

Es handelt sich beim Hesperidin um 5.7.3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon-7-rutinosid (Rutinose = Glucose + Rhamnose).

Beim TMHC wurden die 3'.5'.9'- Hydroxylgruppen des Hesperidin synthetisch methyliert. (s. Abb. 2) Auf diese Weise wird die tautomere Form des Hesperidin, das Chalkon, stabilisiert und kann sich nicht mehr durch Lösen der C2-C3-Doppelbindung in das Hesperidin umlagern, wie das dem Hesperidinchalkon durch die freie C9-OH-Gruppe bei entsprechenden pH-Werten noch möglich ist (Seidenberger, 1974).

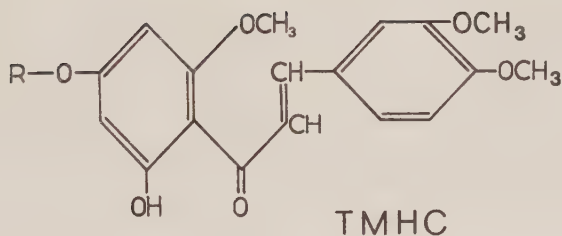


Abb.2 : Strukturformel von TMHC

Wir untersuchten das Trimethylhesperidinchalkon, das in dem von der Firma Lipha vertriebenen Phlebodril^R enthalten ist.

Ruscus-Extrakt

Der Ruscus-Extrakt stammt aus der Stechmyrte, dem stechenden Mäusedorn (*Ruscus aculeatus*), aus dessen Rhizomen er gewonnen wird. Der Halbstrauch gehört zur Familie der Liliaceae (Asparagoideae) und wächst vornehmlich im Mittelmeergebiet.

Chemisch gesehen stellt der Wirkstoff des Ruscus-Extraktes ein Gemisch aus Steroidsaponinen dar. Bei den Steroidsaponinen handelt es sich um Glykoside, deren Aglykon sich vom Cyclopentanoperhydrophenantren-Grundgerüst ableitet. Wir verwendeten bei unseren Experimenten einen von der Firma Lipha hergestellten Ruscus-Extrakt. Im Phlebodril[®] ist er auf 22% Steroidsaponine eingestellt; davon entfallen 11–12% auf Ruscogenin (s. Abb.3) (mündl. Mitteilung der Firma Lipha).

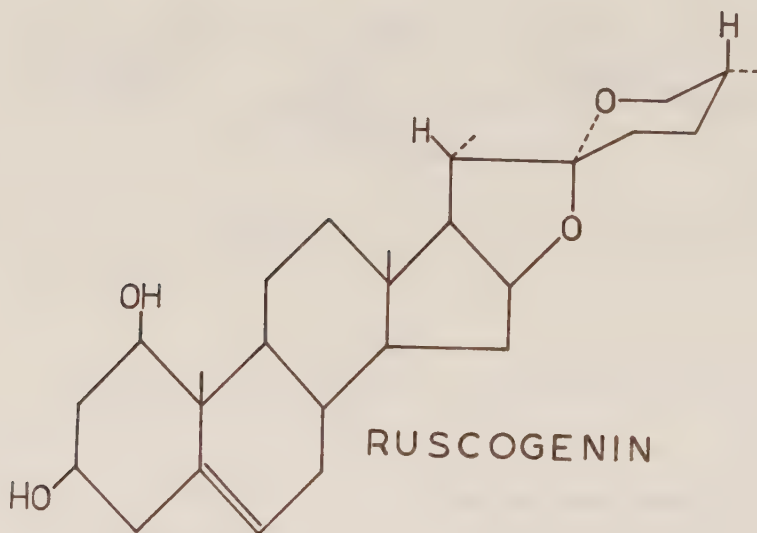


Abb.3 : Strukturformel von Ruscogenin

(O-(β -Hydroxyaethyl)rutoside (HR)

Auch die (O-(β -Hydroxyaethyl)rutoside) gehören zu den Flavonoiden. Sie leiten sich von dem mit 5 OH-Gruppen substituierten Flavon (= Quercetin) ab, an das die Rutinose (Rutinose= Glucose + Rhamnose) gekoppelt ist. Das so gebildete Rutinosid (=Rutosid), das genau gesagt das 5.7.3'.4'.-Tetrahydroxyflavonol-3-rutinosid darstellt und auch als "Rutin" bezeichnet wird, ist bei den einzelnen Komponenten des HR an den phenolischen Gruppen in unterschiedlichem Maße substituiert (s.Abb.4)

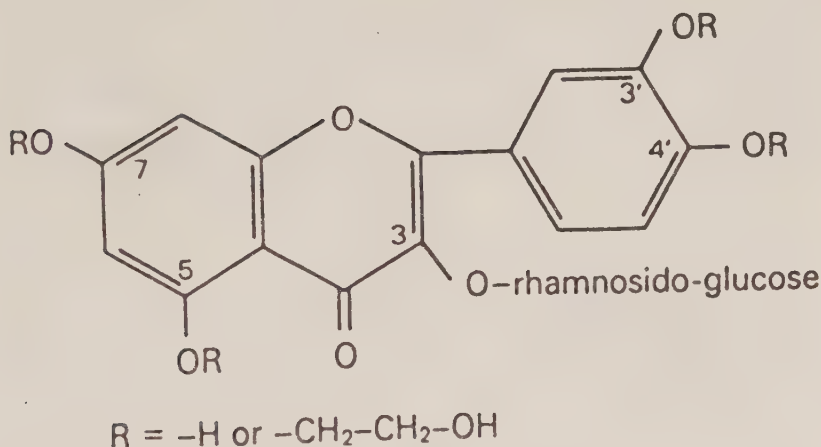


Abb.4 : Strukturformel von Rutin bzw. HR

HR, das somit ein Gemisch aus verschiedenen Rutosiden darstellt, wurde vor ca. 20 Jahren von der Firma Zyma halbsynthetisch hergestellt und unter dem Namen "Venoruton[®]" auf den Markt gebracht. Seine genaue Zusammensetzung ist unter "Material und Methoden" beschrieben.

Aescin

Bei dem Aescin handelt es sich um ein Gemisch aus sauren Triterpenglykosiden, deren Aglykon das Triterpen darstellt (s. Abb.5)

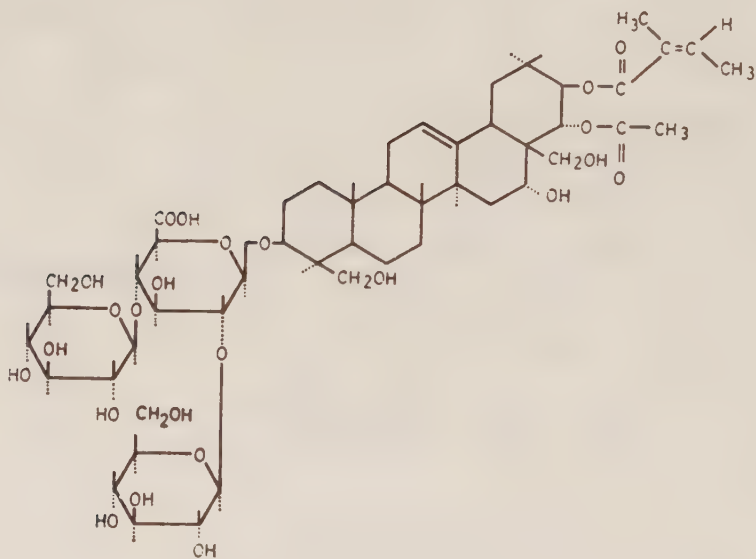


Abb.5 : Strukturformel von Aescin

Das Aescin wird aus Roßkastaniensamen (*Hippocastani semen*) gewonnen. Bei dem von uns eingesetzten amorphen Aescin bleibt — im Gegensatz zum α -Aescin, das ebenfalls auf dem Markt ist — die genuine Stellung der Säuregruppen an COH-21 und COH-22 erhalten. Dieser Zustand wird durch eine besondere Umsetzung des kristallinen Aescins erreicht. Vertrieben wird das amorphe Aescin von der Firma Dr. Madaus unter der Bezeichnung "Reparil".

2.5.2. Pharmakokinetik

TMHC

Studien über die Pharmakokinetik von MHC, den Grundkörper des TMHC, an männlichen Wistarratten ergaben, daß sich eine erste maximale Blutkonzentration 1–2 Stunden, eine zweite 8 Stunden nach oraler Verabreichung von MHC einstellt. Dies läßt auf einen hepatobiliären Kreislauf schließen. Ausgeschieden wird MHC in den ersten 24 Stunden hauptsächlich über den Darm. (Chanal et al, 1981a)

Ruscus-Extrakt

Nach oraler Applikation von Ruscus-Extrakt findet zunächst eine Leberpassage statt. Danach wird der Ruscus-Extrakt über die Galle ausgeschieden und sodann teilweise aus dem Darm rückresorbiert. Die Elimination erfolgt hauptsächlich in den ersten 24 Stunden und zwar zu 28 % über den Harn und zu 38% über den Darm. (Chanal et al, 1981)

HR

Obwohl man für die O-(β -Hydroxyäethyl)rutoside wegen der hohen Wasserlöslichkeit und ihrem durchschnittlichen Molekulargewicht von 750 eine enterale Resorption kaum erwartet, ist diese sowohl für Ratte, Kaninchen und Rhesusaffe als auch für den Menschen nachgewiesen (Barrow, 1974; Förster, 1978; Mikrovitch, 1973).

Innerhalb der einzelnen Komponenten von HR nimmt die Resorption mit

zunehmendem Grad der Hydroxylierung ab. So wird Tetra-HR nur zu einem geringen Teil aus dem Darmlumen aufgenommen.

Was die Verteilung von HR anbelangt, so konnte bereits 1 Stunde nach oraler Applikation ein signifikanter Serumspiegel nachgewiesen werden. Blutspiegelmaxima ergeben sich sowohl für das Tier, als auch für den Menschen zwischen der 2. und 10. Stunde nach der oralen Verabreichung (Jung et al, 1977; Hackett et al, 1976; Mikrovitch, 1973). Knapp 30% der Hydroxyäthylrutoside werden an Plasmaproteine gebunden (Hackett et al, 1976).

Nach intravenöser Applikation von HR werden nach 5 min 20–25% der applizierten Dosis in der Leber wiedergefunden (Mono-HR, Tri-HR).

Der Grad der Metabolisierung von HR in der Leber, der vorallem in einer Glucuronidierung besteht, nimmt mit zunehmendem Maße der Hydroxylierung der Rutoside ab. So wird Tetra-HR nur in unveränderter Form ausgeschieden (Barrow, Griffiths, 1974a, Förster 1978).

Sowohl nach oraler als auch nach parenteraler Zufuhr von HR stellt die biliärenterale Ausscheidung den Haupteliminationsweg dar (Griffiths, 1972, 1975, 1978; Barrow, 1974, 1974a; Hackett, 1977, 1977a, 1979; Förster, 1974). Die renale Exkretion ist bei der parenteralen im Vergleich zur oralen Medikation stärker.

Aescin

Bei Experimenten, bei denen Ratten und Mäuse über die Schlundsonde 0.06–0.25 mg/kg KG ^3H -Aescin erhielten, zeigte sich eine Absorptionsquote von 13 %. Der relative Verlauf der Blutspiegelmaxima nach i.v.-Injektion von Aescin verhält sich bei Ratten, Mäusen und Schweinen gleich. Dies gilt auch für i.v.-Applikation von verschiedenen Dosen Aescin bei Ratten (0,013–1,3 mg/kg KG. Man muß bei den Blutspiegelwerten zwischen einer ersten Phase mit steilem Abfall der Blutwerte (sog. α -Phase), einer Phase mit mittlerer Abfallgeschwindigkeit (β -Phase) und einer Phase mit langsamen Abfall (χ -Phase) unterscheiden. Die α -Phase dauert 10–30 min, die β -Phase 3–5 Stunden (Reparil [®] – Produktinformation).

Aescin wird zu einem großen Teil nach oraler Applikation metabolisiert. So wird bei der Ratte nur 1/6–1/7 der verabreichten Dosis unverändert ausgeschieden. Die Eliminationswege von Aescin nach oraler Gabe verteilen sich zu 3/4 auf die Galle und zu 1/4 auf den Harn (Lang, Mennicke 1972). Nach i.v.-Injektion wird nur ein kleiner Teil Aescin verstoffwechselt, wobei die Metaboliten zum Teil polarer und zum Teil weniger polar als Aescin sind. Die Ausscheidung stellt sich bei den verschiedenen Tierspezies recht unterschiedlich dar, doch im Mittel erfolgt sie mehr über die Galle als über die Nieren (Reparil^R – Produktinformation).

2.5.3. Pharmakodynamik

Während sich die ödemprotektiven Substanzen in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften zum Teil erheblich unterscheiden, gleichen sie sich in der Pharmakodynamik. Im folgenden möchte ich hierzu diejenigen klinischen und tierexperimentellen Studien schildern, bei denen die auch von uns getesteten ödemprotektiven Pharmaka eingesetzt worden waren.

2.5.3.1. Klinische Studien

TMHC und Ruscus-Extrakt

Gounon (Gounon, 1980) untersuchte an 30 Patienten mit verschiedenen Schweregraden des venösen Symptomenkomplexes die kapillarabdichtende und damit ödemprotektive Wirkung von Phlebodril, das ja TMHC und Ruscus-Extrakt enthält. Der Autor benutzte dazu den sog. Landis-Test. Dieser bestimmt den Wasserverlust, der sich nach 20-minütiger Kompression der Extremität mit 80 mm Hg einstellt, anhand des Hämatokritwertes ($\text{Wasserverlust} = 100 - 100 \cdot \frac{H_1}{H_2}$, wobei H_1 = Hämatokrit vor, H_2 = Hämatokrit nach Stauung). Der Wassergehalt war vor der Behandlung (5 Kapseln Phlebodril^R – 4 Wochen täglich) signifikant unterschiedlich.

Klemm (1981) bestimmte als Indikator für die Wirkung von Phlebodril^R den venösen Rückstrom mittels Boluswanderung eines radioaktiv markier-

ten Tracers. Er verabreichte den Patienten 12 Tage 3*2 Kapseln Phlebodril und führte die Messungen vor Therapiebeginn und 24 Stunden nach der letzten Medikamentengabe durch. Es zeigte sich, daß der venöse Abstrom nach Phlebodril^R-Gabe um 10.5 % erhöht war ($p = 0.001$)

HR

Klinische Studien zeigen für HR eine ödemprotektive Wirkung. Nach einmaliger oraler Applikation von Venoruton^R 300 findet bei gesunden Probanden eine Verringerung der Kapillarfiltrationsrate (CFR) statt und zwar durch 900 mg um 50%. Werden 500 mg HR intravenös appliziert, so wird die Reduktion der CFR ebenfalls um ca. 50% bereits wenige Minuten nach der Verabreichung erlangt (Róztocil, 1977; Golden, 1978).

Darüberhinaus wies Prérotsky (1979) nach, daß HR das bei Rauchern geschädigte Endothel schützt. Nach einer Vorbehandlung von gesunden Freiwilligen mit 400 mg HR konnte die durch das Rauchen von 2 Zigaretten erhöhte Zahl von Zelltrümmern signifikant verringert werden.

Aescin

Aescin wurde zur Behandlung von postthrombotischen, intra-oder postoperativen Hirnödemen eingesetzt, die es reduzierte (Heppner, 1967).

Wilhelm K. und Feldmeier Ch.(1977) testeten den Einfluß von Aescin auf postoperative Schwellungen mittels Messung des Wärmepotentials (Infrarotstrahlenmessung) von Weichteilen und Skelett. Die mit dieser Methode gemessene Hautdurchblutung, die bei entzündlichen Prozessen erhöht ist, konnte durch Reparil^R schneller gesenkt werden als bei den Kontrollgruppen.

2.5.3.2. Tierexperimentelle Studien

In welchem(n) Stadium(ien) der Ödempathogenese die in der Klinik erprobten Pharmaka eingegriffen haben, geht aus diesen Studien nicht hervor.

Wo der Ansatzpunkt der ödemprotektiven Substanzen nun liegt, wurde anhand verschiedener Ödemmodelle untersucht.

2.5.3.2.1. . Entzündliches Ödem

Durch Phospholipase, Dextran, Formalin, Ovalbumin bzw. Histamin ausgelöstes Ödem

Injiziert man Dextran an der Ratte, so wird speziell an diesem Tier eine allergische Reaktion ausgelöst. In diesem Zusammenhang entsteht auch ein entzündliches Ödem. Entzündliche Vorgänge laufen auch ab, wenn man den Tieren Phospholipase verabreicht. Die Phospholipase setzt aus den Phospholipiden die Arachidonsäure frei, die Vorläufersubstanz von Entzündungsmediatoren wie der Leukotriene und Prostaglandine ist.

Hammersen verabreichte der Ratte Dextran i.p. (Hammersen und Möhring, 1968, 1970; Hammersen, 1972) bzw. Phospholipase in das Scrotum (Hammersen und Möhring, 1972; Hammersen, 1972). Daraufhin untersuchte er im ersten Fall die Endstrombahn des subkutanen Bindegewebes der Pfote, im zweiten Fall die des Musculus cremaster elektronenmikroskopisch und stellte zahlreiche knopfförmige Zytoplasmavortreibungen des Endothels der Kapillaren fest. Darüberhinaus fand er eine Vermehrung und Vergrößerung der intraendothelialen Vesikel sowie transzelluläre Kanäle als auch interzelluläre größere Lücken, sog. "gaps". Beim Phospholipaseödem traten zusätzlich noch Stechapfelformen von Erythrozyten auf.

All die geschilderten Symptome wurden durch HR verhindert bzw. reduziert, wenn man es intravenös in einer Dosierung von 100 mg/kg KG oder oral in einer Dosierung von 300 mg/ kg KG verabreicht.

Gross (Gross, 1950) verursachte an der Ratte ein lokales entzündliches Ödem durch die subkutane Injektion von Formalin in die Pfote. Durch 100 mg/kg KG Rutin, das ja den Grundkörper des HR darstellt, wurde die Formalinentzündung gehemmt. Damit lag die Menge an Rutin, die zur Reduzierung des Formalinödems benötigt wurde, in derselben Größenord-

nung wie die des HR zur Minderung des Dextran-, bzw. Phospholipase-ödems.

Eine 200 mal geringere Dosis an Aescin im Vergleich zu HR und Rutin genügte, wenn man es i.v. appliziert, um die Exsudatbildung in der Bauchhöhle von Ratten zu verringern, welche durch i.p.-Injektion von Formalin ausgelöst wurde (Rothkopf und Vogel, 1976).

Oral verabreicht, reichte eine 600fach geringere Dosis an Aescin als an HR zur Ödemprotektion aus. Dies wurde von Lorenz und Marek (1960) an dem durch Ovalbumin verursachten entzündlichen Ödem an der Rattenpfote nachgewiesen.

HMC, von dem das TMHC abstammt, wurde an einem weiteren Ödemmodell getestet. Tarayre und Lauressergues (1975) verabreichten der Ratte den Entzündungsmediator Histamin intradermal. 750 mg HMC/kg KG, oral appliziert, als auch die intravenöse Gabe von 5 mg HMC/kg KG reduzierten das Ödem signifikant.

2.5.3.2.2. Stauungsödem

Darüberhinaus ist es möglich, durch bloße Stauung des venösen Abflusses ein sog. Stauungsödem auszulösen. Dieses entspricht zunächst einem hämodynamischen Ödem, doch können auch noch entzündliche Reaktionen auftreten (entzündliches Ödem).

Lund und Mitarbeiter (1970) verursachten ein solches Stauungsödem am Rattenschwanz durch 12-stündige Ligatur an dessen Wurzel. HR (2 mal täglich 500 mg/kg KG s.c.) bewirkten eine wesentliche Reduzierung des Ödems. Die in den ähnlichen Versuchen von Gloor et al (1974) angewandten kleineren Dosen HR (50 mg/kg KG i.m.) ließen das Rattenschwanzvolumen unbeeinflusst.

Felix (1968, 1971) löste ein Stauungsödem an beiden hinteren Oberschenkeln narkotisierter Katzen mittels einer Staumanschette aus. Die Bildung des Stauödems wurde plethysmographisch verfolgt. In die linke hintere Ar-

teria femoralis wurde 1 Stunde vor Beginn der Stauung HR(10 mg/kg KG) infundiert. Solange der Staudruck 30 mm Hg nicht überstieg, konnte das Stauungsödem in der linken, mit HR behandeltem Extremität im Gegensatz zu dem im rechten, unbehandelten Hinterlauf signifikant gemindert werden.

2.5.3.2.3. Lymphödem

Zur Provokation eines experimentellen Lymphödems hatten Börcsök et al. (1970) folgendes Verfahren ausgearbeitet. Bei Ratten wurden die Halslymphknoten in Narkose unterbunden. Bei den Kontrolltieren, die nach der Operation täglich physiologische Kochsalzlösung i.p. erhielten, stieg das Kopf-Hals-Volumen von 100 % präoperativ auf 110%. Bei der mit O- β -Hydroxyäthylrutosiden (200 mg/kg KG i.p.) behandelten Gruppe wurde der postoperative Wert signifikant gesenkt.

2.5.3.2.4. Strahleninduziertes Ödem

Klemm (1970) bestrahlte am Kaninchenohr das Gewebe in der Umgebung eines künstlich erzeugten Loches. HR beschleunigte die Wundheilung. Derselbe Autor (1978) zeigte am Modell der Kaninchenohrkammer (Klemm, 1967), daß HR bei Schädigung der terminalen Strombahn durch ionisierende Strahlen eine schützende Wirkung auf die Kapillaren und besonders auf deren Endothelzellen ausübt. Auch bei der Strahlentherapie von Tumoren kann HR verwendet werden (Fritz-Niggli, 1978, 1983; Wurst et al., 1978; Hammersten, 1987).

2.5.3.2.5. Ödem durch Hitze

Piller (1977) studierte, wie verschiedene parenteral verabreichte Dosen Trihydroxyäthylrutosid, der Hauptkomponente des HR, welches als "Troxerutin" vertrieben wird, auf ein durch 54 °C heißes Wasser hervorgerufenen Verbrennungsödem wirkte. Dabei verminderten 425 und 850 mg/kg KG/ Tag den Umfang des Gliedmaßenödems und die Abschwellungszeit am besten.

2.5.3.2.6. Ödeme durch kapillarschädigende Substanzen

Felix (1978, 1983, 1983a, 1984) erzeugte am Hinterlauf der Katze mittels Durchströmung von kapillarschädigenden Substanzen, wie Polidocanol, Thiopental und Etacrynsäure ein nicht-entzündliches, eiweißreiches, sog. "morphologisches" Ödem. HR, 45 min vor Gefäßschädigung intravenös appliziert, wirkte ab einer Dosis von 20 mg/ kg KG ödemprotektiv. Derselbe Effekt konnte durch die perorale Verabreichung von 200 mg HR/ kg KG im Akutversuch 4 Stunden vor der Ödemerzeugung sowie durch die orale Gabe von 20 mg HR/ kg KG (4 Tage- täglich) im chronischen Versuch erzielt werden. Hiermit hat Felix gleichzeitig gezeigt, daß HRutoside bei chronischer peroraler Applikation stärker wirken als bei akuter intravenöser.

An dem oben beschriebenen Versuchsmodell wies Felix (Felix,1984) nach, daß Ruscus-Extrakt und TMHC, in einer Dosierung von 20 mg/kg KG i.v. verabreicht, das durch Etacrynsäure ausgelöste Proteinödem in Muskel und Haut des Hinterlaufes signifikant hemmte. Niedrigere (10 mg /kg KG) und höhere Dosen (50 mg/kg KG) von TMHC und Ruscus-Extrakt zeigten nur einen geringeren und teilweise nicht signifikanten ödemprotektiven Effekt.

2.5.4. Mögliche Wirkungsmechanismen

Die verschiedenen Ansatzpunkte, die sich aus den einzelnen Ödemmodellen für den Wirkungsmechanismus der verschiedenen ödemprotektiven Pharmaka ergeben, sehen zwar bei jedem Modell unterschiedlich aus, gelten dann aber jeweils für alle daran getesteten Substanzen.

2.5.4.1 Wirkung auf Entzündungsmediatoren

Untersucht man die Wirkungsweise dieser ödemprotektiven Substanzen, beispielsweise auf das entzündliche Ödem, so muß man in Betracht ziehen, daß bei jeder Entzündung Mediatoren wie Histamin, 5-HT, Bradykinin und Prostaglandin im Spiel sind. Lorenz et al. (1973) erwähn-

te, daß in einer Untersuchung mit verschiedenen Flavonoiden einige die Histidindecaboxylase, welche ja die Umwandlung von Histidin in Histamin katalysiert, hemmten. HR reduzierte die Aktivität der sauren Histidindecaboxylase des Rattenmagens um 60%, Tri-O-(β -hydroxyäthyl)rutin ("Troxe-*ru*tin") , senkte die Enzymaktivität sogar um 80%.

Eine andere Forschergruppe, nämlich Gecse und Mitarbeiter (Gecse, 1972) zeigten, daß die Vorbehandlung mit Hydroxyäthylrutin (100–500 mg/kg KG i.p.) oder Hesperidinmethylchalcon (250–500 mg/kg KG i.p.) die durch Bradykinin verursachte Kapillardurchlässigkeit erheblich verringert. Man nimmt an (Forth, 1983), daß Bradykinin die gefäßerweiternde Wirkung durch Kontraktion der Endothelzellen im Venulenumbereich ausübt. HR – so fanden Gecse et al. (Gecse, 1972) am isolierten glatten Muskel des Uterus heraus – hemmt das Kontraktionsvermögen des Bradykinin.

Baumann et al. (1979) wiesen nach, daß Bioflavonoide je nach ihrer Struktur die Prostaglandin-Synthetase mehr oder weniger hemmen.

Einen Überblick über die Wirkung der Flavonoide und teilweise auch des Saponins Aescin auf die erwähnten Entzündungsmediatoren gibt Gabor (1979).

Saponine sollen vorallem in die initiale Phase des Entzündungsprozesses eingreifen. (Vogel, Übel, 1960; Rothkopf, Vogel, 1976)

Kato und Gözsy (Kato und Gözsy, 1969) sehen die wesentliche pharmakologische Wirkung der wasserlöslichen Flavonoide darin, daß sie die Mastzellen vor Degranulation während Stressperioden schützen und gleichzeitig das anti-inflammatorische Hormon Noradrenalin beeinflussen.

So deuteten ihre Experimente darauf hin, daß Flavonoide entweder durch Hemmung der Katechol-O-Methyltransferase (COMT) oder der Monoaminoxidase (MAO), derjenigen Enzyme also, welche den Abbau von Noradrenalin katalysieren, die Inaktivierung von Noradrenalin verhindern. Daß Flavonoide Einfluß auf die genannten, in den Katecholaminabbau zwischengeschalteten Enzyme ausüben, postulieren auch Spector, Willoughby (1960), Estler (1971), Gabor (1972), Schwabe, Flohe (1972), Guglier (1973) und Tarayre, Laouressergues (1977).

2.5.4.2. Wirkung auf Basallamina

Leu et al. (1968) stellten fest, daß beim peritonealen Fremdkörpergranulom nach HR-Verabreichung die Basallamina verdickt war. Ob dieses Phänomen Einfluß auf die Kapillarpermeabilität zeigt, bleibt dahingestellt.

2.5.4.3. Wirkung auf Membranen allgemein

Hammersen (1978, 1983) fand mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen, daß die Wirksamkeit von HR sowohl beim entzündlichen (durch Dextran bzw. Phospholipase ausgelöst) als auch beim morphologischen Ödem auf einem allgemeinen protektiven Membraneffekt beruht. So konnte er beim Ödemmodell vom Entzündungstyp — wie unter "Pharmakodynamik" geschildert — zeigen, daß die Zytoplasmavortreibungen sowie die vermehrte Bildung von intraendothelialen Vakuolen als auch von transzellulären Kanälen durch Hydroxyäthylrutoside verhindert oder zumindest beträchtlich reduziert werden.

Aber auch die Abflachung des Endothels und die Ausbildung tiefer Invaginationen der luminalen Zellmembran, welche beim morphologischen Ödem auftraten, wurden durch HR weitgehend gehemmt.

Einer Stabilisierung von Permeabilitätsstörungen in Membranen schreibt Fritz-Niggli (Fritz-Niggli, 1978) die Schutzwirkung von HR bei der Strahlentherapie gegenüber gesundem Gewebe zu. Seiner Meinung nach wird damit ein normaler Energie-Pool dieser Zellen aufrechterhalten, während das maligne Gewebe in seiner Strahlenreaktion weniger oder gar nicht modifiziert wird, da sein Energiegehalt nicht derart membrangebunden ist.

2.5.4.4. Wirkung auf Makrophagen, Proteolysesteigerung

Andere Autoren (Casley-Smith und Bolton, 1973; Casley-Smith und Piller, 1974; Casley-Smith und Window, 1975; Casley-Smith und Földi-Börcsök, 1974; Piller, 1975; Lecomte et al, 1971, 1974; Földi, 1978) kamen zu dem Ergeb-

nis, daß Benzopyrone, zu denen die Flavonoide gehören, nicht dahingehend wirken, daß sie den Proteinaustritt aus den Kapillaren in das umgebende Gewebe reduzieren, sondern— genau im Gegenteil— ihn durch Öffnung von Poren im Endothel erhöhen. Trotzdem nimmt das Proteinödem ab.

Casley-Smith (1976) und Piller (1977) haben Beweise dafür, daß dies daher rührt, daß im umgebenden Gewebe eine Proteolyse, vermittelt durch Makrophagen des Interstitiums, stattfindet. Radioaktiv-markiertes Protein bzw. nicht-metabolisierbares PVP (Polyvinyl-Pyrrolidon) wurde nämlich in Rattenbeine injiziert. Diese waren normal, lymphödematös, durch Hitze oder sowohl durch Hitze als auch durch Lymphödeme verletzt worden (Casley-Smith und Piller, 1974 ; Piller und Casley-Smith, 1975).

Während die Clearance für PVP nach Pharmakongabe erheblich variierte, wurde der Clearance— Wert für Proteine durch die Pharmaka erhöht. Die Autoren stellten die Hypothese auf, daß die Makroproteine vermutlich durch eine intrazellulär in den Makrophagen stattfindenden Proteolyse in kleinere Peptide und Aminosäuren zerlegt werden. Für diese Bruchstücke besteht dann ein Konzentrationsgradient vom Interstitium zum Plasma. So ist es den Proteinbruchstücken bis zu einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10000 (Lospalluto et al, 1971, aus Földi, Casley-Smith, 1978) möglich, nahezu ungehindert durch das Endothel zurückzudiffundieren. PVP, deren Clearance wohl durch andere Wirkungen der Pharmaka je nach Zustand des Rattenbeines erheblich schwankte, diente dabei als Kontrolle.

2.6. Problemstellung der Arbeit

Alle bisherigen Studien zur Pharmakodynamik der ödemprotektiven Substanzen erforderten Versuche am lebenden Organismus.

In der vorliegenden Arbeit sollte — um die Zahl der Tierexperimente einzuschränken — mit der isolierten Ohr randvene des Schweines ein in-vitro-Modell für das nicht-entzündliche, morphologische Gefäßwandödem aufgebaut werden, an der man die "Venennittel" testen kann.

Anschließend sollte das Gefäßwandödem charakterisiert werden.

An ödemprotektiven Substanzen sollten TMHC, Ruscus-Extrakt, HR und Aescin unmittelbar erprobt und Untersuchungen zu deren Wirkungsmechanismus durchgeführt werden.

Ob Aescin, das beim Gefäßwandödem keine reduzierende Wirkung zeigte, oral verabreicht überhaupt schützend wirkt, sollte am interstitiellen morphologischen Ödem des Katzenhinterlaufes (Methode nach Felix, 1983) geklärt werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1. Lösungen

Chloralose (Chloralanhydrat)	Merck
Ketanest (10 mg/ml)	Parke Davis
Evansblue	Merck
Etacrynsäure - "Hydromedin"	MSD Pharma
Natriumhydrogencarbonat	Delta Pharma
Heparin	Braun Melsungen
Gesamteiweiß - "Merckotest"	Merck

Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung

NaCl	118.3	mM
KCl	4.7	mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1.2	mM
KH ₂ PO ₄	1.2	mM
CaCl ₂	2.5	mM
NaHCO ₃	25.0	mM
Glucose	11.1	mM
Pyruvat	0.5	mM
Ca-EDTA	0.026	mM

Boviserin (natives Normalserum vom Rind)

Behring

HCl conc.

Merck

Zephirol

Bayer

Chloroform

Merck

Diphenylborsäure – β – aminoäthylester

Fluka

1 %ig in Methanol

3.1.2 Pharmaka

Trimethylhesperidinchalcon (TMHC)

Lipha

Ruscus-Extrakt

Lipha

HR

"Venoruton"

Zyma

Gemisch aus O- β -Hydroxyaethylrutosiden:

7,3'4'-Trihydroxyaethylrutosid 50.1 %

7,4' – Dihydroxyaethylrutosid 21.9 %

7,3' – Dihydroxyaethylrutosid 11.7 %

3' – Monohydroxyaethylrutosid 7.3 %

5,7,3',4'- Tetrahydroxyaethylrutosid 5.1 %

3,7,3',4'- Tetrahydroxyaethylquercitin 3.4 %

Rutin 0.5 %

Aescin-Dragees "Reparil"

Dr. Madaus

Aescin-Ampullen "Reparil"

Dr. Madaus

3.1.3. Geräte

Kieselgelfolien 60 F₂₅₄

Merck

Desaga Spray Gun

UV-Lampe

Atemthermistor nach Felix (Felix, 1962)

Schlauchpumpe , Ismatec SB-5

Infusionspumpe, Fa. Braun, Melsungen

Kristallmembranometer, Fa Hansen, Kopenhagen

Photometer PMQ 3, Fa Karl Zeiss

AVL- Gas Check 939

3.2. METHODEN

Sowohl das Gefäßwandödem an der isolierten Ohrrendvene des Schweines, als auch das interstitielle Ödem an der Katzenextremität wurde mittels Etacrynsäure ausgelöst.

In beiden Fällen unterschieden wir zwischen der Permeabilität von Eiweiß und der niedermolekularen Flüssigkeit, welche an der Katzenextremität jeweils an ein und demselben Tier, in vitro jeweils an verschiedenen Ohren gemessen wurde.

Auch differierte der Nachweis für niedermolekulare Flüssigkeit in- vitro und in-vivo.

3.2.1. Etacrynsäureödem an der isolierten Ohrrendvene des Schweines

Aus Schweineohren, die am Schlachthof vor dem Brühen der Tiere abgeschnitten worden waren, wurde jeweils die Ohrrendvene herauspräpariert (Schneider, 1985). Zu diesem Zweck legten wir die Vena lateralis vom proximalen Ende her ein Stück frei, unterbanden alle Abgänge und kanülierten einen etwa 2 cm langen Abschnitt von beiden Seiten. Das Endothel der Gefäße blieb dabei weitgehend unversehrt (De la Lande, 1965). Anschließend wurde die Vene in eine spezielle Halterung derart eingespannt, daß sie einen durchschnittlichen Tonus von 5 – 15 mm Hg aufwies und in ein mit Carbogen (95 % O₂ – 5% CO₂) durchperltes Organbad gebracht, in dem sich Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung (39 °C bzw. 0–1 °C) befand. (Methode nach De la Lande, 1966).

In einigen Versuchsserien wurde die oben genannte Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung durch eine Ca⁺⁺-freie Krebslösung, in weiteren Experimenten durch eine Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung mit dreifacher Ca⁺⁺-Ionen-Konzentration ersetzt.

Vor Versuchsbeginn wurden die Venen mindestens 1/2 Stunde in dem umgebenden Milieu äquilibriert.

3.2.1.1. Versuchsablauf (s. Abb.6)

Der Versuchsablauf gliederte sich in 3 Abschnitte :

1. Phase vor der Ödemerzeugung
2. Ödemerzeugung
3. Phase nach der Ödemerzeugung,

1. Phase vor der Ödemerzeugung : Dauer : 15 bzw. 60 min

Das Pharmakon wurde appliziert. (= "Pharmakongabe")

(2. In einigen Versuchen wurde das Pharmakon 20 min ausgespült.)

3(2). Ödemerzeugung : Dauer : 2.5, 5 bzw. 7.5 min.

Die ödemerzeugende Substanz Etacrynsäure wurde verabreicht. (= Schädigungsphase)

4(3). Phase nach der Ödemerzeugung : Dauer : 5 min (= "Protein"-bzw. "Evansblue"applikation)

In diesem Versuchsabschnitt dringt die Eiweißlösung (6%), welche zum Nachweis der Proteindurchlässigkeit dient bzw. die Evansbluelösung (0.012 %), eine Farbstofflösung (MG.960), welche die Permeabilität für niedermolekulare Flüssigkeit kennzeichnet, in die Venenwand ein. Als Eiweißlösung benutzten wir ein Serum ("Boviserin"), an dessen Proteine zu 96 % der Farbstoff Evansblue gekoppelt war.

Der Druck, unter dem die Evansblue—bzw. Eiweißlösung appliziert wurde, betrug 30 cm H₂O; er lag damit etwa doppelt so hoch wie derjenige, der in den Schweineohrvenen mittlerer Größe herrscht. Wir wählten jedoch diesen höheren Druck, da ein solcher auch in den unteren Extremitäten aller aufrechtgehenden Lebewesen herrscht. Noch größere Drucke von 50 bzw. 90 cm H₂ O brachten die Venen zum "Platzen". In einigen gesonderten Experimenten wendeten wir einen Druck von 0 bzw. 15 cm H₂ O an.

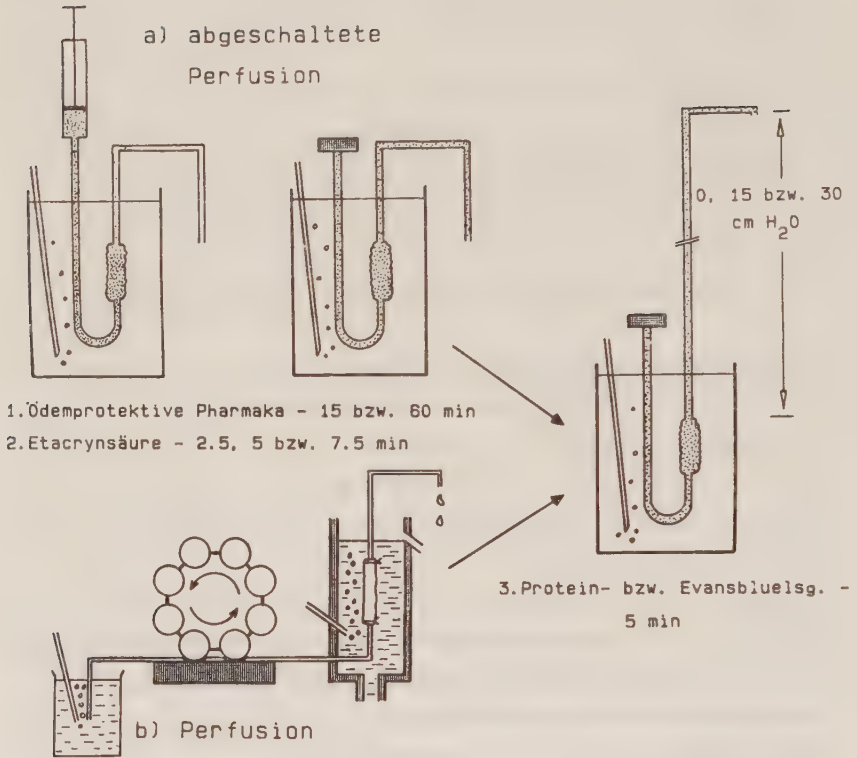


Abb.6 : Schematische Darstellung des Versuchsablaufes zum Etacryn-
säureödem an der isolierten Ohr randvene des Schweines

Die genannten Substanzen wurden während der einzelnen Versuchsabschnitte zum Teil intra-, zum Teil extravasal verabreicht und in den Kontrollexperimenten jeweils durch Krebslösung ersetzt.

Bei den meisten Experimenten ließen wir – um den Zustand des sistierenden Blutflusses, der "Stase", nachzuahmen, die den Extremzustand der chronischen Veneninsuffizienz kennzeichnet, die Lösungen in Ruhe einwirken (s. Abb. 6 a), indem wir das Schlauchsystem abklemmten. Während einiger Experimente wurden die Pharmaka während der 1. und 2. Phase des Versuches perfundiert. Am Ende des Versuchs wurden die Venen so lange mit Krebslösung durchspült, bis die austretende Flüssigkeit farblos war.

Sodann wurde das Gefäß vom umgebenden Bindegewebe befreit, auf der Länge von einer Kanülenspitze zur anderen abgeschnitten und bis zur Gewichtskonstanz an der Luft getrocknet. Anschließend bestimmten wir das Gewicht der Vene und den Übertritt von Protein und niedermolekularer Flüssigkeit in die Venenwand.

Da letzteres Verfahren im Prinzip auch für die in-vivo Versuche gilt, wird es im Anschluß daran geschildert.

3.2.2. Etacrynsäureödem am Hinterlauf der Katze (Felix, 1983)

Die Experimente wurden an 10 männlichen und 8 weiblichen Hauskatzen mit einem Gewicht von durchschnittlich 2.5 kg durchgeführt.

Die Katzen der Verumversuche wurden 5 Tage lang mit Aescin-Dragees zu 0.5, 2 und 5 mg/Tier/Tag vorgefüttert.

3.2.2.1. Narkose

Anästhetisiert wurden die nüchternen Tiere über eine Magensonde mit 60 mg Chloralose/kg KG. Die Chloralose wurde zu diesem Zweck in warmem Wasser gelöst. Nach etwa 1 Stunde erreichte die Narkose eine ausreichende Tiefe. Diese hielt dann während des ganzen Versuches an. Bei Bedarf erhielten die Katzen ein-oder mehrmals 0.5 ml Ketanest[®] (10 mg/ml) i.m. injiziert.

3.2.2.2. Präparation

Die Tiere, die zur Erhaltung ihrer Körpertemperatur im narkotisierten Zustand auf einen 37°C warmen OP-Tisch lagen, wurden im Bereich des Kehlkopfes und an den beiden Hinterläufen geschoren.

Sodann legten wir die Trachea unterhalb des Kehlkopfes auf einem etwa 2 cm langen Stück frei, eröffneten sie mittels eines Schnittes auf einer Knorpelspange und führten eine gläserne Trachealkanüle ein. An diese war ein sog. "Thermistor" (Felix, 1962) angeschlossen. Unter Thermistor versteht Felix Widerstände, die temperaturempfindlich sind und zur Strömungsmessung verwendet werden. In diesem Fall wurde in der Trachealkanüle der Luftstrom gemessen und so konnte die Atmung fortlaufend registriert werden.

Auf beiden Oberschenkeln wurde ein Hautschnitt parallel zu den Vasa femorales gezogen, diese jeweils freigelegt und deren Zu- bzw. Abgänge unterbunden. Darauf wurden in die Arteria und Vena femorales derjenigen Extremität, in der später das Ödem erzeugt wurde ("Ödembein") bzw. in die Vena femoralis des anderen Hinterlaufes ("Kontrollbein") PVC-Schlauchringe eingebunden, von denen Abzweigungen zu den Meßapparaturen führten.

Anschließend wurde beim "Ödembein" der parallel zu den Vasa femorales verlaufende Nervus saphenus sowie auf der lateralen Gliedmaßen- seite zwischen dem Tuber ischiadicum und dem Trochanter major der Nervus ischiadicus auf einer Länge von ca. 2 cm freigelegt. Zur Unterbindung des Kollateralkreislaufes wurde an diesem Bein die gesamte Oberschenkelmuskulatur möglichst proximal zu beiden Seiten der Gefäße und des Nervenstranges mit zwei etwa 1 cm breiten PVC-Bändern kräftig abgeschnürt. Das Blut lief nun ausschließlich durch die Arteria femoralis ins "Ödembein" und durch die Vena femoralis wieder heraus.

Im folgenden wollten wir — um vasoaktive Eigenschaften der verabreichten Pharmaka messen zu können — den Tonus der präkapillären Gefäße und — da wir ja Ödemeversuche durchführen — den transkapillären Flüssigkeits-

austausch im Ödembeln registrieren. Dazu bedienten wir uns der strömungskonstanten Perfusion (s.3.2.2.3.), die von einem isovolumetrischen Zustand (s.3.2.2.4.) ausgeht.

3.2.2.3. Strömungskonstante Perfusion

In starren Röhren gilt:

$$\Delta P = V \cdot R \quad \text{wobei}$$

ΔP : Druckunterschied im Verlauf
der Röhren
 V : Stromzeitvolumen
 R : Widerstand

Das gesamte Kreislaufsystem ist als ein Röhrenwerk aufzufassen, nur mit dem Unterschied, daß die Blutgefäße elastisch sind.

Um nun in einer Versuchsanordnung eine Aussage über die Veränderung einer dieser Größen (ΔP , V , R) treffen zu können, muß ein Parameter konstant gehalten werden. Wir wählten dazu V .

Um die Hinterläufe der Katze strömungskonstant zu perfundieren, leiteten wir das aus der A. femoralis in das Bein fließende, sowie das auf der venösen Seite aus dem Bein in die V. femoralis fließende Blut über dieselbe pulsierende Rollenpumpe (s.Abb. 7)

Da das Produkt aus V und R in unserem Modell bei strömungskonstanter Perfusion auch physiologische Werte annehmen sollte, stellten wir das Stromzeitvolumen der Pumpe so ein, daß der "arterielle Perfusionsdruck", der nach der Pumpe gemessen wurde, im Mittel etwa gleich dem vor der Pumpe gemessenen Blutdruck war.

Mißt man also in dem Gefäßbereich distal der A. und V. femorales die Druckänderung bei strömungskonstanter Perfusion, so ist sie ein Maß für den Widerstand, und damit den Tonus des entsprechenden Gefäßabschnittes.

Auf diese Weise registrierten wir durch Einschaltung eines Manometers auf der arteriellen Seite nach der Pumpe den "arteriellen Perfusionsdruck" (s.o.) und damit den Arterioltonus.

Arteriell wurde vor der Pumpe der systemische Blutdruck gemessen.

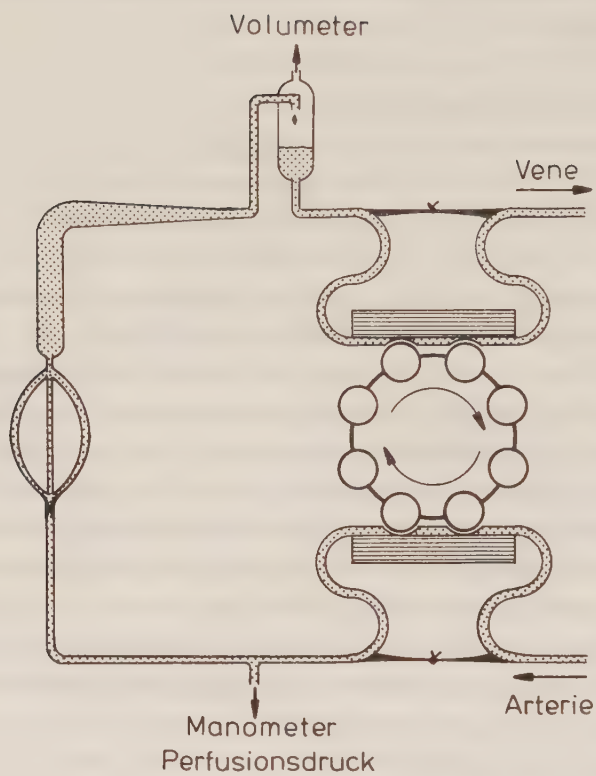


Abb.7 : Strömungskonstante Perfusion an der Katzenextremität

3.2.2.4. Isovolumetrischer Zustand

Da die Erzeugung eines Ödems sich ja auf den Flüssigkeitsaustausch in den, Kapillaren auswirkt, suchten wir zu Beginn des Versuches von einem Zustand auszugehen, bei dem Filtration und Reabsorption sich im Gleichgewicht halten. In welchem Maße auf der arteriellen Seite filtriert bzw. auf der venösen Seite reabsorbiert wird, hängt nach dem Starling'schen Gesetz (s. Einleitung) vom hydrostatischen Druck ($= p_{\text{hydrostat.}}$) in Arterie/Vene und im Interstitium bzw. vom kolloidosmotischen Druck ($= p_{\text{kolloid.}}$) in Arterie/Vene und im Interstitium ab.

Da alle Größen außer $p_{\text{hydrostat.}}$ auf der arteriellen und venösen Seite gleiche Werte annehmen (s. Einleitung), hängt das Filtrations-Reabsorptionsgleichgewicht ausschließlich von der Differenz $p_{\text{hydrostat.}}$ (Arterie) $- p_{\text{hydrostat.}}$ (Vene) ab und kann daher durch Einstellen des $p_{\text{hydrostat.}}$ (Vene) zu Beginn des Versuchs ins Gleichgewicht gebracht werden. Um die Filtrations-Reabsorptionsrate und damit die arterio-venöse Strömungsdifferenz in der vorliegenden Versuchsanordnung zu messen, wurde zwischen das Bein und der Pumpe auf der venösen Seite ein Überlaufgefäß angebracht; je nachdem in welcher Höhe es angebracht wurde, stellte sich ein anderer Venendruck ($= p_{\text{hydrostat.}}$ (Vene)) ein.

Das Überlaufgefäß wurde an ein sog. Volumeter angeschlossen, das aus einem Pistonrekorder besteht, der am Hebel links und rechts vom Drehpunkt je eine Blende trägt. Je nach dem verdrängten Flüssigkeitsvolumen im Überlaufgefäß verstellt sich der Hebel und die Blenden verdecken einen Fotowiderstand mehr oder weniger. Die Fotowiderstände sind in eine Wheatstone-Brücke geschaltet. Wir stellten nun zu Beginn des Versuchs die Position des Überlaufgefäßes und damit den Venendruck so ein, daß sein Flüssigkeitsspiegel konstant blieb und damit sich Filtration und Reabsorption im Gleichgewicht befanden.

Die Höhe des Flüssigkeitsspiegels im Überlaufgefäß ist ein Maß für die arterio-venöse Strömungsdifferenz, aber auch für den Venentonus.

Wird bei gleichbleibendem Tonus der Venen und laufender Pumpe mehr filtriert als reabsorbiert, so sinkt die Flüssigkeit im Überlaufgefäß und umgekehrt. Bei konstanter arterio-venöser Strömungsdifferenz nimmt der Flüssigkeitsspiegel im Überlaufgefäß ab, wenn die Venen dilatieren, er steigt, wenn die Gefäße kontrahieren. Man geht nun davon aus, daß langfristige Änderungen in der Höhe des Flüssigkeitsspiegels des Überlaufgefäßes Verschiebungen des Flüssigkeitshaushaltes und kurzfristige Änderungen Tonusverschiebungen darstellen.

3.2.2.5. Versuchsablauf

Der Versuch selbst, in dessen Verlauf das interstitielle Ödem erzeugt wurde, gliederte sich, wie die in-vitro Versuche, in folgende 3 Abschnitte:

- a) Phase vor der Ödemerzeugung
- b) Ödemerzeugung
- c) Phase nach der Ödemerzeugung

a) Phase vor der Ödemerzeugung

Im ersten Versuchsabschnitt wurde, wie oben beschrieben, strömungskonstant mit Blut (5 ml/min) perfundiert. Es herrschte ein isovolumetrischer Zustand (s.o.).

Zunächst wurden die Ausgangswerte der Blutgase (pH, pO_2 , pCO_2) und des Venenvolumens registriert. Die Blutgaswerte wurden ermittelt, um eine (durch die Narkose oder anderswie) bedingte Verschiebung des Säure-Basen-Gleichgewichtes des Blutes durch Gabe von $NaHCO_3$ auszugleichen. Die Kreislaufparameter (systemischer Blutdruck, arterieller Perfusionsdruck, Venentonus) wurden während des gesamten Versuches gemessen.

5 Minuten nach Versuchsbeginn entnahmen wir venöses Blut aus dem "Kontroll"bein und zentrifugierten dieses anschließend 10 min lang bei

3800 rpm, um das Plasma (Plasma I) abzutrennen. Dieses wurde zur Messung des Eiweißgehaltes des Blutes benutzt.

Ab der 15. Minute wurde über eine Infusionspumpe (0.5 ml/min) die zur Eiweißmarkierung dienende Evansbluelösung (50 mg /kg KG) dem "Kontrollbein" des Tieres zugeführt.

10 Minuten nach der Evansblue-Gabe entnahmen wir ein zweites Mal venöses Blut (Plasma II) aus dem "Kontroll"bein und zentrifugierten dieses wieder 10 min bei 3800 rpm. Das dabei gewonnene Plasma wurde zur Bestimmung des Evansblue-Gehaltes, der sich vor der Schädigungsphase im Blut befand, verwendet.

b) Ödemerzeugung

5 Minuten nach der letzten Blutentnahme begann am "Ödem" bein die Phase der Ödemerzeugung durch Etacrynsäure, welche etwa 30 min dauerte und sich in 3 Abschnitte unterteilte.

Während dieser Schädigungsphase bestand keine Verbindung zwischen der Extremität und dem großen Kreislauf des Tieres (die entsprechenden Schläuche wurden abgeklemmt). Der Venendruck wurde auf 0 mm Hg gesenkt, indem wir das Überlaufgefäß unterhalb des Tischniveaus stellten. So konnte der hydrostatische Druck in den Kapillaren möglichst niedrig gehalten und ein Übertreten des Perfusats in das Gewebe verhindert werden.

α) Auswaschen des Blutes aus der Extremität

Um zu verhindern, daß die ödemerzeugende Substanz an Plasmaproteine bindet bzw. mit diesen oder anderen Bestandteilen des Blutes reagiert, wurde das "Ödem"bein zunächst "blutleer" gespült.

Dazu preßten wir durch einen Zugang in den arteriellen Schlauch 50 ml physiologische Kochsalzlösung unter einem Druck von 0.5 atm. orthograd in die Arteria femoralis und ließen das verdrängte Blut durch einen Ausgang auf der venösen Schlauchseite auf.

Die ersten 10 ml dieses Blutes, die vorwiegend Blutkörperchen darstellen, wurden dabei zur Stabilisierung des Kreislaufes reinfundiert. Das Gesamtvolumen an Blut, das ausgewaschen wurde, notierten wir.

β) Spülung der Extremität mit der ödemerzeugenden Substanz

An den arteriellen Zugang zum Bein wurde eine Infusionspumpe angeschlossen und mit Hilfe dieser wurde mit derselben Stromstärke, mit der wir auch in der 1. Phase des Versuchs, vor der Schädigung, perfundierten, das "Ödembein" mit 50 ml Etacrynsäure durchspült. Das Perfusat wurde wieder aufgefangen, gemessen und anschließend verworfen.

γ) Auswaschen der ödemerzeugenden Substanz

Um zu verhindern, daß die ödemerzeugende Substanz in den Körperkreislauf gelangt, wurde die Etacrynsäure anschließend mit 50 ml physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen. Wir stellten dabei die Perfusionsstärke auf denselben Wert wie unter β) ein.

Die verdrängte Menge Etacrynsäure wurde dabei wieder notiert.

c) Phase nach der Ödemerzeugung

Nach der Beinspülung wurde die Extremität wieder an den Körperkreislauf angeschlossen und 45 min mit Blut (5 ml/min) perfundiert. Am Ende dieser Zeit töteten wir die Tiere und entnahmen Muskel- und Hautproben. Dabei wurde die Haut am "Ödembein" etwa 1 cm unterhalb der PVC-Bänder und beim "Kontroll"bein etwa von derselben Höhe ab, jeweils bis zur Ferse entfernt und die Muskeln in diesem Bereich bis zum Knochen hin abpräpariert.

Im Gegensatz zu den in-vitro Experimenten, bei denen die Venen in einem Organbad hingen und ganz mit Elektrolytlösung durchtränkt waren, kann der Übertritt von niedermolekularer Flüssigkeit hier direkt an dem Wassergehalt der Proben gemessen werden. Wie bei den Venen war der Evansbluegehalt von Haut und Muskel ein Maß für das aus dem Blut ins Gewebe aus-

tretende Eiweiß.

Zu diesem Zweck wurde die Haut in gleich große Stücke geschnitten, die Muskelmasse in einem Mixer homogenisiert und dann jeweils ein Teil der Gewebe zur Messung des Flüssigkeits-, der andere zur Bestimmung des Eiweißgehaltes herangezogen. (s.u.)

3.2.3. Bestimmung des Protein- bzw. Flüssigkeitsgehaltes der Venen aus den in-vitro Versuchen bzw. der Muskel- und Hautproben aus den in-vivo Versuchen

3.2.3.1. Proteinbestimmung

Die isolierten Venen sowie die Haut- und Muskelproben der Katze wurden nach der Methode von Beach und Steinetz (1961) jeweils in einer definierten (s.Tab.) Menge HClconc. 12 Stunden mazeriert, anschließend mit der sechsfachen (Venen) bzw. doppelten (Haut- und Muskelproben) Menge an Zephrol ausgeschüttelt und 10 min stehen gelassen.

Dabei bindet das bei der Mazerierung freigesetzte Evansblue an Zephrol. Schließlich wurde dem Zephrol die gleiche Menge Chloroform zugesetzt und dieses Gemisch unter mehrmaligen Schütteln für 10 min stehen gelassen. In dieser Chloroformphase löste sich dann der Evansblue-Zephrolkomplex selektiv. Die beiden Phasen wurden schließlich durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 3800 rpm voneinander getrennt. Der Nachweis des Evansblue in der Chloroformphase erfolgte photometrisch bei 620 nm.

Um von dem Evansbluegehalt der Proben auf deren Eiweißgehalt schließen zu können, wurde das Serum bzw. Plasma (I), welches kein Evansblue enthielt, sowie das Serum bzw. Plasma (II), an das Evansblue gekoppelt war, ebenfalls nach der Methode von Beach und Steinetz (s.o.) aufgearbeitet und eine Eiweißbestimmung von Serum (Plasma) I nach Biuret durchgeführt. Die einzelnen Ansätze zur Evansbluemessung sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab.1 Aufarbeitung der Venen bzw. Haut-und Muskelproben nach Beach und Steinetz.

	Salzsäure	Zephirol	Chloroform
Vene (1–5 µg)	100 µl	600 µl	600 µl
Hautprobe (3g)	10 ml	20 ml	20 ml
Muskelprobe (7g)	10 ml	20 ml	20 ml
Serum I u. II (100 µl)	500 µl	3 ml	3 ml
Plasma I u. II (100 µl)	2 ml	4 ml	4 ml

Zur Biuretbestimmung wurden 3* je 100 µl Serum (Plasma) I mit je 5 ml Biuret I und 3* je 100 µl Serum (Plasma) I mit je 5 ml Biuret II gemischt. Die Biuret-Proben wurden photometrisch bei 545 nm gemessen, und zwar die Biuret I—Ansätze gegen reines Biuret I ($=E_1$), die Biuret II—Proben gegen aqua bi—dest ($=E_2$). Anschließend wurde $\Delta E = E_1 - E_2$ berechnet.

Um eine Eichgerade zu erhalten, bestimmten wir auf dieselbe Weise E von verschiedenen Mengen 6 %iger Albuminlösung.

Berechnung des Proteingehaltes von Serum (Plasma) I

$$\text{Proteingehalt } G \text{ (g/100 ml)} : \quad G = \frac{\Delta E_{\text{Probe}} * 6}{\Delta E_{\text{Albumin}}}$$

Berechnung des Proteingehaltes der Venen bzw. der Haut- und Muskelproben

1) Die Extinktion von 1 mg Protein in 1 ml Chloroform (= E₀) wurde aus den Plasmaproben nach folgender Formel errechnet:

$$E_0 = \frac{(E_2 - E_1) * 0,96 * 3 (4)}{G} , \text{ wobei}$$

- E₁ : Extinktion des Serums (Plasmas) vor Evansblue-Gabe (Serum bzw. Plasma I)
- E₂ : Extinktion des Serums (Plasmas) nach Evansblue-Gabe (Serum bzw. Plasma II)
- 0,96 : Entspricht der 96%igen Bindung von Evansblue an die Serum- bzw. Plasmaproteine
- 4 (3): Die Extraktion erfolgte in 3 (Venen) bzw. 4 (Muskel und Haut) ml Chloroform. In 1 ml ist die Extinktion also 4 bzw. 3 mal so groß
- G : Gesamteiweißkonzentration des Plasmas in g/100 ml nach der Biuret-Methode

2) Der Proteingehalt der Probe/ml Chloroform (=P) ergab sich, wie folgt:

$$P = \frac{E}{E_0} * 0.6 \text{ (bzw. 20)} , \text{ wobei}$$

- E : Gemessene Extinktion der Probe
- E₀ : Extinktion von 1 mg Protein in 1 ml Chloroform
- 0.6 : Verwendete Chloroformmenge (Venen)
- 20 : " (Muskel- u. Hautproben)

3) Die Berechnung des Proteingehaltes (mg)/g Trockengewicht erfolgte nach

$$\frac{P}{T}, \text{ wobei}$$

T : Trockengewicht der zu mazerierenden Probe

Für Muskel und Haut gilt:

$$T = G_1 * \frac{c_2}{c_1}, \text{ wobei}$$

G₁ : Feuchtgewicht der zu mazerierenden Probe

c₁ : Feuchtgewicht der zur Flüssigkeitsbestimmung eingewogenen Probe

c₂ : Trockengewicht der zur Flüssigkeitsbestimmung eingewogenen Probe

3.2.3.2. Flüssigkeitsbestimmung

a) der Venen

Die Venen wurden, wie diejenigen, welche zur Bestimmung des Proteinübertritts herangezogen wurden, nach der Methode von Beach und Steinetz (1961) aufgearbeitet.

Um den Extinktionswert der Venenproben bei 620 nm in Beziehung zu setzen zu ihrem Evansbluegehalt, stellten wir eine Eichgerade für Evansblue auf. Dazu lösten wir 5, 10, 20, 30, 40 und 50 µg Evansblue (0.012 %ig) in je 500 µl HClconc. und behandelten das Gemisch genauso wie die Venen.

Für die Eichgerade ergab sich über das Verfahren der linearen Regression eine Steigung von 0.01683 µg⁻¹.

Für den Evansbluegehalt der Venenproben folgt daraus:

$$\text{Evansblue } (\mu\text{g}) = \frac{E}{0.016833} \quad , \text{ wobei}$$

E : gemessene Extinktion

0.016833 : Steigung

b) der Haut -und Muskelproben

Der Wassergehalt der Muskel- und Hautproben in ml/g Trockengewicht wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{c_1 - c_2}{c_2} \quad , \text{ wobei}$$

c_1 : Probengewicht vor Trocknung (g)

c_2 : Probengewicht nach Trocknung (g)

3.2.3.3. Statistische Auswertung

Zunächst wurde untersucht, ob die Etacrynsäure in der Ohr randvene bzw. der Katzenextremität ein Ödem auslöst. Zu diesem Zweck wurde der Flüssigkeits- bzw. Proteingehalt der geschädigten Vene bzw. der Haut und des Muskels der geschädigten Extremität mit dem der ungeschädigten Vene bzw. des ungeschädigten Hinterlaufes mittels des t-Tests verglichen. Bei den Katzenexperimenten wurde - da "Ödem"-und "Kontrolle" beim demselben Tier angehören - der gepaarte t-Test, bei den in-vitro-Versuchen, je nachdem, ob die Ohren von demselben Schwein oder von verschiedenen stammten, der

gepaarte bzw. ungepaarte t-Test angewandt.

In jedem Fall ermittelte der statistische Test aus den jeweiligen Mittelwerten und deren SE (Standarderror = mittlere Abweichung des Mittelwertes), ob die Stichproben ein- und derselben Grundgesamtheit oder 2 verschiedenen angehören und sich damit in Protein- bzw. Flüssigkeitsgehalt unterscheiden.

Dies geschah mittels der Prüfgröße t im t-Test. Je nach diesem Wert t wird die Nullhypothese (die beiden Stichproben gehören derselben Grundgesamtheit an) mit einer Wahrscheinlichkeit (= Signifikanz p) abgelehnt. Es bestand ein echter Unterschied zwischen den Stichproben, wenn $p \leq 0.05$.

Folgende Symbole gelten für die Signifikanzen:

$0.01 \leq p \leq 0.05$	*
$0.001 \leq p \leq 0.01$	**
$p \leq 0.001$	***

Bei den in-vivo-Experimenten ist es darüber hinaus — da das "Ödembein" und "Kontrollbein" ein und demselben Tier angehören — möglich, eine Aussage über das "Ödemwasser" bzw. "Ödemprotein" zu treffen. Es errechnet sich jeweils aus der Differenz des Protein- bzw. Wassergehaltes von "Ödem"- und "Kontrollbein".

Sodann wurde die Wirkung der "Venenumittel" betrachtet. Ein ödemprotektiver Effekt lag vor, wenn sich die mit dem Pharmakon behandelten, geschädigten Proben von den behandelten, ungeschädigten nicht mehr signifikant unterschieden. Dies gilt natürlich nur, wenn sich die ungeschädigten Kontrollen von den behandelten, ungeschädigten Proben nicht signifikant unterscheiden.

Bei den Katzenversuchen wurde die ödemprotektive Wirkung bei der endgültigen Auswertung noch schärfer gefaßt. Wir sahen sie als erwiesen an, wenn ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen "Ödemwasser" bzw. "Ödemprotein" von behandelten zu unbehandelten Tieren vorlag.

3.2.4. Dünnschichtchromatographie

Zum Nachweis, ob Etacrynsäure mit einem der Komponenten von TMHC, Ruscus-Extrakt, HR bzw. Aescin chemisch komplexiert, wurden einerseits die ödemprotektiven Pharmaka und andererseits jeweils ein Gemisch aus dem ödemprotektiven Pharmakon und Etacrynsäure mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt.

Wir führten die Dünnschichtchromatographie mit Kieselgelfolien der Fa. Merck mit der Bezeichnung 60 F 254 durch.

Jeweils 10 µl der einzelnen Proben wurden 1 cm vom unteren Rand der Folie entfernt im Abstand von 1.5 cm mit einer graduierten Mikropipette punktförmig aufgetragen.

Anschließend stellten wir die Folien in eine 25 * 25 * 10 cm große Trennkammer. Deren Kammersättigung erreichten wir durch ein fettfreies Filterpapier im Format von 40 * 15 cm, das wir mit dem bereits eingefüllten Fließmittel tränkten und U-förmig in den Glastrog legten.

Als Fließmittel zur Auftrennung der Flavonoide HR und TMHC diente zum einen n-Butanol-Methanol-aqua dest im Verhältnis 10:1:3 (Geißler, 1975), zum anderen Äthylacetat-Ameisensäure-Eisessig-H₂O im Verhältnis 100:11:11:27 (Wagner, 1983). Bei letzterem wurden zunächst die ersten 3 Bestandteile zusammengeschüttet und dann unter kräftigem Schütteln das Wasser hinzugefügt.

Für die Saponingemische Aescin und Ruscus-Extrakt verwendeten wir als Fließmittel Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10). Dabei setzten wir äthanolfreies Chloroform ein.

Wir ließen das Fließmittel jeweils bis zum oberen Rand der Folie vordringen, nahmen diese dann aus der Trennkammer und trockneten sie mit einem Fön.

Die auf dem Chromatogramm aufgetrennten Substanzen wurden im UV-Licht nachgewiesen. Die Flavonoide färbten wir vorher an, indem wir die

Folien mittels eines Desaga-Spray-Guns mit dem Naturstoffreagenz nach Neu (1957) besprühten.

Anhand der Rf-Werte der einzelnen Substanzen wurden die Chromatogramme dann ausgewertet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Zur Wirkung von TMHC, Ruscus-Extrakt, HR und Aescin auf das Etacrynsäureödem an der isolierten Ohrrendvene (Vena auricularis) des Schweines

An unserem Modell für das experimentelle Gefäßwandödem an der isolierten Ohrrendvene des Schweines lösten wir eine vermehrte Permeabilität mittels Etacrynsäure aus. Da sich die Gefäße in einem Organbad befinden, also mit Elektrolytlösung durchtränkt sind und nicht noch mehr Flüssigkeit aufnehmen können, wurde dann auch "nur" eine erhöhte Durchlässigkeit und nicht unmittelbar ein Ödem gemessen.

Dies spielt jedoch für die Erprobung ödemprotektiver Substanzen, die ja immer dann eingesetzt werden sollen, wenn die Kapillar- bzw. Gefäßwände in irgendeiner Weise geschädigt werden, keine Rolle.

In unserer Versuchsanordnung wurde zwischen der Permeabilität niedrig- und hochmolekularer Stoffe unterschieden. Erstere wurde anhand des Farbstoffs Evansblue (M.G. 960) untersucht, letztere mittels einer Eiweißlösung, an die Evansblue gekoppelt war.

Wir untersuchten außerdem, auf welche Weise die Proteine aus dem Lumen in die Gefäßwand gelangen.

Schließlich wurde der Einfluß der ödemprotektiven Pharmaka auf die Permeabilität sowohl der ungeschädigten, als auch der geschädigten Venen beobachtet, sowie versucht, den Wirkungsmechanismus der Ödemprotektiva aufzuschlüsseln.

4.1.1. Kontrollversuche

4.1.1.1. Erstellung eines Ödemmodells

Zur Auslösung einer gesteigerten Proteinpermeabilität wirkte Etacrynsäure in den einzelnen Experimenten in einer Konzentration von 0.05 % bzw. 0.1 % jeweils 2.5, 5 bzw. 7.5 min auf die Gefäße ein. Die Proteinlösung stand unter einem Druck von 30 cm H₂O.

Weder in diesen geschädigten Venen, noch in den ungeschädigten Referenzgefäßen drang das Eiweiß extraluminal aus den Venen heraus.

Die Applikation von 0.05 %iger Etacrynsäure (s.Tab. 2, Abb.8) verursachte bei einer Einwirkdauer von 2.5 min noch keine, bei einer Einwirkdauer von 5 und 7.5 min jedoch eine statistisch signifikante Erhöhung des Proteinübertritts in das Venengewebe im Vergleich zu den ungeschädigten Gefäßen ($p=0.04$ bei einer Einwirkzeit von 5 min, $p=0.014$ bei einer Einwirkzeit von 7.5 min). Die Menge des Proteins, das in die Gefäßwand übergetreten ist, nahm dabei mit zunehmender Einwirkzeit der Etacrynsäure zu. So gelangten nach 2.5 min 49 µg Protein/mg Vene, nach 5 min 62 µg Protein/mg Vene und nach 7.5 min 69 µg Protein/mg Vene in das Gefäß. In die ungeschädigten Venen war 35 µg Protein/mg Vene übergetreten.

Bei der Applikation von 0.1 % iger Etacrynsäure (s.Tab.2, Abb.8) erreichte bei allen Einwirkzeiten mehr Eiweiß (2.5 min: 59 µg Protein/mg Vene, 5 min: 80 µg Protein/mg Vene, 7.5 min: 74 µg Protein/ mg Vene) die Gefäßwand als bei der Anwendung von Etacrynsäure in einer Konzentration von 0.05 %.

0.1 % ige Etacrynsäure rief schon nach einer Einwirkdauer von 2.5 min eine statistisch signifikante Vermehrung des Proteinübertritts hervor ($p=0.01$). Nach einer Einwirkzeit von 7.5 min ergab sich eine Signifikanz von $p=0.003$.

Eine vermehrte Durchlässigkeit für Evansblue wurde durch 0.1 %ige Etacrynsäure (Einwirkdauer : 2.5 min) hervorgerufen.

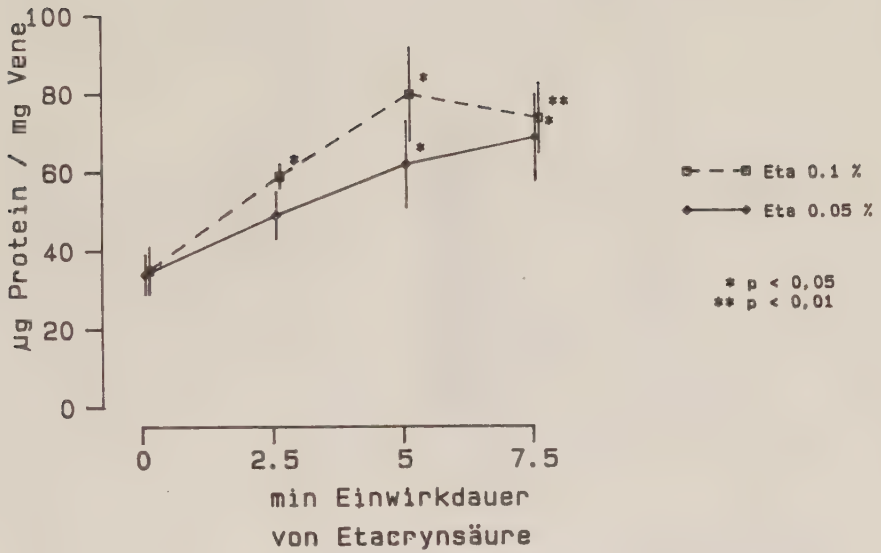


Abb.8 : Proteinübertritt in die Kontrollvenen nach verschiedenen Einwirkzeiten der Etacrynsäure (0.05 % bzw. 0.1 %)

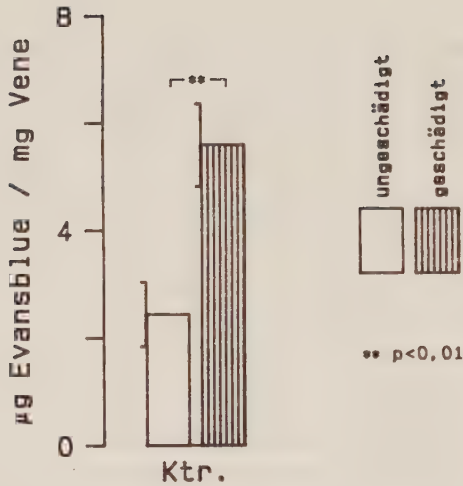


Abb. 9 Flüssigkeitsübertritt in die Kontrollvenen

Versuchsverlauf:

1. Pharmakongabe, 15 min – Krebslösung i.+e.vas.

2. Schädigungsphase, 2.5 min

ungeschädigte Venen: s.l.

geschädigte Venen: Etacrynsäure (0.1 %) i.vas., Krebslsg. e.vas.

3. Evansblue (0.012 %)applikation, 5 min – unter einem Druck von 30 cm H₂O i.vas., Krebs e.vas.

Es gelangten 2,44 μg Evansblue/ mg Vene in die ungeschädigten Gefäße und 5,6 μg Evansblue/ mg Vene in die geschädigten Gefäße (s.Tab.2, s. Abb.9). Der Unterschied in der Permeabilität zwischen geschädigten und ungeschädigten Gefäßen war mit $p=0.003$ signifikant.

Tab.2

Protein-und Flüssigkeitsübertritt in die Kontrollvenen nach verschiedenen Einwirkzeiten der Etacrynsäure (0.05 bzw. 0.1 %)

	<u>unge.</u>	<u>ge.</u> Etacrynsäure					
		0.05 %ig			0.1 %ig		
		2.5	5	7.5	2.5	5	7.5 min
n:	10	10	6	6	6	5	8
Protein	35	49	62	69	59	80	74
($\mu\text{g}/\text{mg}$ Vene):							
SE:	6	6	11	11	3	27	9
p:		n.s.	0.04*	0.014*	0.01*	0.05	0.003 **
n:	16				12		
Protein:	2.44				5.6		
($\mu\text{g}/\text{mg}$ Vene)							
SE:	0.6				0.8		
p:		0.003 **					

"unge." : ungeschädigt, "ge." : geschädigt

SE: Standarderror

p(Signifikanz) : geschädigte Gefäße im Vergleich zu ungeschädigten Gefäßen

4.1.1.2. Zum Mechanismus der Etacrynsäure

Wie gelangen die Proteine bzw. das Evansblue in die ungeschädigte Venenwand? Wie beeinflußt die Etacrynsäure diese Vorgänge?

Hydrophile niedermolekulare Substanzen wie Evansblue treten vorallem mittels Filtration in die ungeschädigte Venenwand über. (s.Einleitung)

Für die Passage von hydrophilen Proteinen werden hauptsächlich zwei Transportmechanismen diskutiert: Mikropinozytose und Filtration. (s. Einleitung). Die Mikropinozytose unterscheidet sich von anderen Transportmechanismen vorallem dadurch, daß sie bei 0°C hemmbar ist. Bei der Filtration handelt es sich um einen Prozeß, der entlang eines hydrostatischen oder osmotischen Gradienten abläuft (Forth, 1983)

Die ungeschädigte Ohrrendvene des Schweines zeigte bei 0°C etwa die gleiche Proteinpermeabilität (16 µg Protein/ mg Vene) wie bei 39°C (14 µg Protein/mg Vene), bei der geschädigten Vene war die Durchlässigkeit von 46 µg Protein/mg Vene bei 39°C auf 18 µg Protein/mg Vene bei 0°C gesunken. (s.Abb.10 ,s.Tab.3)

Dazu muß bemerkt werden, daß die Experimente bei 0°C zu einem viel späteren Zeitpunkt stattfanden als die unter 4.1.1.1. und sich die Kontrollwerte bei 39°C wohl durch unterschiedliche Bedingungen bei Haltung und Fütterung der Schweine änderten. Eine irgendwie andersgeartete Präparationstechnik oder Versuchsdurchführung kann als Ursache für die verschiedenen Ergebnisse ausgeschlossen werden, da jeder Schritt eingehend überprüft wurde.

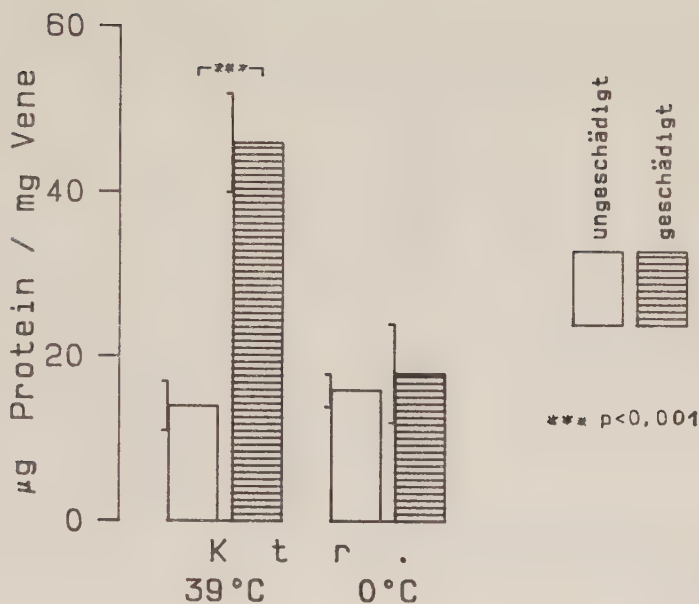


Abb. 10 Vergleich des Proteinübertrittes in die Kontrollvenen bei 39°C
und bei 0°C

Versuchsverlauf:

1. Pharmakongabe, 15 min – Krebslösung i.+e.vas.

2. Schädigungsphase, 2.5 min

ungeschädigte Venen: s.1.

geschädigte Venen: Etacrynsäure (0.1 %) i.vas., Krebs e.vas.

3. Protein (6%lg)applikation, 5 min – unter einem Druck von 30 cm H₂O
i.vas., Krebs e.vas.

Die Experimente wurden entweder bei einer Temperatur von 39°C oder bei 0°C durchgeführt.

Tab.3

Vergleich des Proteinübertrittes in die Kontrollvenen bei 39°C und bei 0°C

	39° C		0°C	
	unge.	ge.	unge.	ge.
n:	7	7	5	5
Protein (µg/mg Vene)	14	46	16	18
SE:	3	6	2	6
p:	└ 0.0 *** ┐		└ n.s. ┐	

"unge.": ungeschädigt, "ge.": geschädigt

SE: Standarderror

p: Signifikanz

Bei 39° C drang umso mehr Protein in die ungeschädigten und geschädigten Gefäße ein, je höher der Druck war, unter dem die Proteidlösung stand. So gelangten unter einem Druck von 0 cm H₂O 17 µg Protein/mg Vene in die ungeschädigten und 26 µg Protein/mg Vene in die geschädigten Venen; bei Erhöhung des Druckes auf 15 cm H₂O traten 32 µg Protein/mg Vene in die ungeschädigten und 31 µg Protein/mg Vene in die geschädigten Venen über und unter einem Druck von 30 cm H₂O drangen 35 µg Protein/mg Vene in die ungeschädigten, 59 µg Protein/mg Vene in die geschädigten Venen ein. (s. Tab.4, s. Abb. 11)

Proteine werden also in die ungeschädigten Gefäße filtriert. Was die Versuche über die Wirkung der Etacrynsäure aussagen, wird in der Diskussion erläutert.

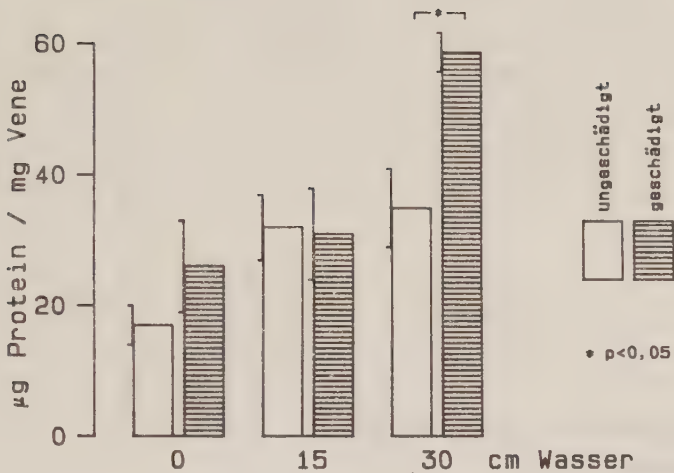


Abb. 11 Proteinübertritt in die Kontrollvenen unter verschiedenen Drücken

Versuchsverlauf:

1. Pharmakongabe, 15 min. — Krebslösung i.+e.vas.

2. Schädigungsphase, 2.5 min.

ungeschädigte Venen: s.1.

geschädigte Venen: Etacrynsäure (0.1 %lg) i.vas., Krebs e.vas.

3. Protein (6%lg)applikation, 5 min — unter einem Druck von 0, 15 bzw. 30 cm H₂O i.vas., Krebs e.vas.

Tab.4

Proteinübertritt in die Kontrollvenen unter verschiedenen Drücken

	p= 0 cm H ₂ O		p=15 cm H ₂ O		p=30 cm H ₂ O	
	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.
n:	7	7	6	5	10	6
Protein	17	26	32	31	35	59
(µg/mg Vene)						
SE:	3	7	5	7	6	3
p:	└ n.s. ┘		└ n.s. ┘		└ 0.01 ┘*	

"unge.": ungeschädigt, "ge.": geschädigt

SE: Standarderror

p: Signifikanz

4.1.2. Verumversuche

Die Verumversuche sollten zeigen, ob TMHC, Ruscus-Extrakt, HR und Aescin an der isolierten Ohrrendvene, die künstlich erzeugte Permeabilität reduziert und damit ödemprotektiv wirkt. Es wurde 2.5 min mit 0.1%iger Etacrynsäure geschädigt.

Ein ödemprotektiver Effekt liegt vor (s. Methodik), wenn das Pharmakon die Protein-bzw. Flüssigkeitspermeabilität der ungeschädigten Venen im Vergleich zu den Kontrollen nicht ändert, diejenige der geschädigten Gefäße jedoch senkt. Die behandelten geschädigten Gefäße unterscheiden sich dann nicht signifikant von den behandelten ungeschädigten Venen.

Die Versuchsanordnung bietet die Möglichkeit, die Pharmaka intravasal oder extravasal ins Organbad zu verabreichen. Bei intravasaler Applikation ge-

langt das Pharmakon direkt an das Endothel, dem Angriffsort der Etacrynsäure; bei extravasaler Gabe erreicht es das Endothel erst nach Diffusion durch Adventitia und Media, es muß in das Gewebe eindringen.

Für jedes Pharmakon wurde ermittelt, in welcher Konzentration, bei welcher Einwirkdauer und Applikationsart es optimal den durch Etacrynsäure bedingten vermehrten Proteinübertritt reduziert. Die günstigste Form der Applikation wurde zur Minderung des Flüssigkeitödems eingesetzt.

Anschließend wurden jeweils Experimente zum Wirkungsmechanismus durchgeführt.

4.1. 2.1. TMHC

4.1. 2.1.1. Ödemprotektive Wirkung

Obermayr (1982) beschreibt, daß TMHC in einer Konzentration von 0.005 % am besten die glatte Muskulatur der isolierten Pfortader der Ratte vor einer Schädigung durch Etacrynsäure schützt.

In dieser Konzentration verabreichten wir TMHC den Ohrrandvenen i.+e.vas. für 15 min und ließen es während der Schädigungsphase i.+e.vas bzw. während der Protein-bzw. Evansblueapplikation e.vas. im Organbad. (s. Tab.5) Die Proteinpermeabilität der ungeschädigten Gefäße wurde dadurch gegenüber den ungeschädigten Kontrollen signifikant ($p=0.032$) gesenkt. Es gelangten 19 µg Protein/mg Vene (Ktr. 35 µg/mg Vene) in die Venen. (s. Tab.6, Abb.12)

Auch die Proteinmenge, welche in die geschädigten Venen gelangt war, nahm von 59 µg/mg Vene in den geschädigten Kontrollen auf 48 µg/mg Vene ab (s. Tab.6, Abb.12)

Da TMHC die Proteinpermeabilität der ungeschädigten Gefäße ändert, ergibt sich seine ödemprotektive Wirkung nicht entsprechend unserem Schema, sondern aus der Senkung sowohl der Proteindurchlässigkeit der ungeschädigten, als auch der geschädigten Venen.

Versuchsablauf	Kontrolle		TMHC	
	unge.	ge.	unge.	ge.
Krebs i.+e.vas. (15 min)	+		+ TMHC i.+e.vas.	
Krebs i.+e.vas. (2.5 min.)	+	+Eta i.vas.	+ TMHC i.+e.vas.	+ Eta i.vas. + TMHC i.+e.vas.
Protein bzw. Evansblau i.vas. unter p=30 cm Wasser (5 min) Krebs e.vas.	+	+	+TMHC e.vas.	+ TMHC e.vas.

Tab.5 : Einfluß von TMHC (0.005 %ig) auf die Protein- bzw. Evans bluepermeabilität der Venen

"Eta": Etacrynsäure, "i.vas.": intravasal, "e.vas.": extravasal

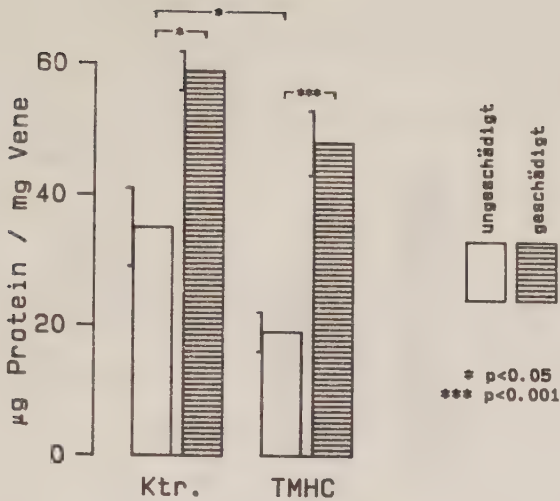


Abb.12 Einfluß von TMHC (0.005 %ig) auf die Proteinpermeabilität der Venen

Versuchsverlauf:

1. Pharmakongabe, 15 min – Kontrollen : Krebs i.+e.vas.

– Verumexp.: TMHC i.+e.vas.

2. Schädigungsphase, 2.5 min

ungeschädigte Venen – s.1.

geschädigte Venen – Kontrollen: Etacryns. (0.1%) i.vas., Krebs e.vas.

– Verumexp.: TMHC + Etacryns.(0.1%) i.vas.,
TMHC e.vas.

3. Protein (6%)applikation, 5 min – unter Druck von 30 cm H₂O i.vas.

– Kontrollen: Krebs e.vas.

– Verumexp.: TMHC e.vas.

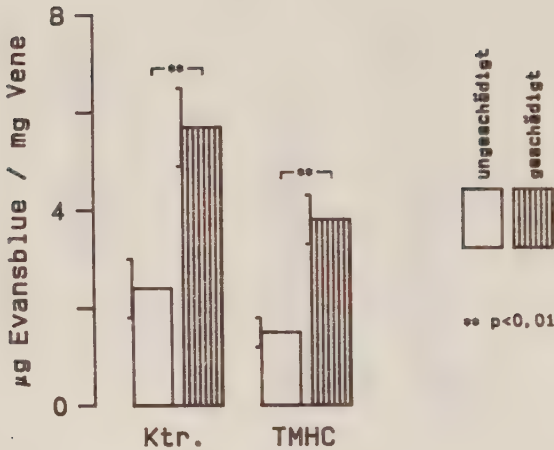


Abb.13 Einfluß von TMHC (0.005 %) auf die Flüssigkeitspermeabilität der Venen

Versuchsablauf:

1. Pharmakongabe, 15 min — Kontrollen: Krebs i.+e.vas.

— Verumexp.: TMHC i.+e.vas.

2. Schädigungsphase, 2.5 min

ungeschädigte Venen: s.: 1.

geschädigte Venen — Kontrollen: Etacryns. (0.1%) i.vas., Krebs e.vas.

— Verumexp.: TMHC + Etacryns. (0.1%) i.vas.,
TMHC e.vas.

3. Evansblue (0.012%)applikation, 5 min— unter Druck von 30 cm H₂ O i.vas.

— Kontrollen: Krebs e.vas.

— Verumexp.: TMHC e.vas.

TMHC (0.005%ig) minderte auch den Evansbluegehalt der ungeschädigten Venen von 2.44 μg Evansblue/mg Vene auf 1.52 μg Evansblue/mg Vene und der geschädigten Venen von 5.6 μg Evansblue/mg Vene auf 3.84 μg Evansblue/mg Vene (s. Tab.6, Abb.13)

So reduziert TMHC — wenn auch nicht signifikant — eine vermehrte Flüssigkeitspermeabilität.

Tab.6

Einfluß von TMHC (0.005 %ig) auf die Protein-bzw. Evansbluepermeabilität der Venen

	Kontrolle		TMHC	
	unge.	ge.	unge.	ge.
n:	10	6	9	11
Protein	35	59	19	48
(µg/mg Vene)				
SE	6	3	3	5
p:	0.01 *		0.0 ***	
	0.03 *			
n:	16	12	5	5
Evansblue				
(µg/mg Vene)	2.44	5.6	1.52	3.84
SE:	0.6	0.8	0.32	0.48
p:	0.003 **		0.005 **	

"unge": ungeschädigt "ge": geschädigt

SE: Standarderror

p: Signifikanz

4.1.2.2. Ruscus-Extrakt

4.1.2.2.1. Ödemprotektive Wirkung

Die optimale ödemprotektive Konzentration für Ruscus-Extrakt ermittelte Obermayr (1982) an derselben Versuchsanordnung, an der sie TMHC testete, zu 0.005 %.

Auch an der isolierten Ohrrendvene ließen wir Ruscus in einer Konzentration von 0.005 % (bezogen auf den Saponingehalt) einwirken, und zwar auf dieselbe Weise wie TMHC. (s. Abb. 14, Ruscus I, Tab. 7, "Ru I").

Die ungeschädigten Venen unterschieden sich mit einem Proteingehalt von 33 µg/mg Vene nicht signifikant von den ungeschädigten Kontrollen (35 µg Protein/mg Vene). (s. Abb. 14, s. Tab. 8 "Ru I") Auch in die geschädigten Gefäße drang nicht signifikant mehr Protein ein als in die ungeschädigten, nämlich 43 µg/mg Vene. Somit zeigte Ruscus-Extrakt in der Konzentration von 0.005%, wenn es während der Etacrynsäureapplikation intravasal anwesend war, eine ödemprotektive Wirkung auf den Proteinübertritt.

In bezug auf den Übertritt von niedermolekularer Flüssigkeit ergab sich bei gleicher Verabreichung von Ruscus wie oben in den ungeschädigten Gefäßen ein Evansbluegehalt von 2.73 µg/mg Vene (Ktr. : 2.44 µg Evansblue-/mg Vene) (s. Tab. 7, 8 "Ru I", Abb. 15). Die Menge an Evansblue in den geschädigten Venen betrug 3.08 µg/mg Vene und unterschied sich damit nicht signifikant von dem Evansbluegehalt in den ungeschädigten Venen. (s. Tab. 7, 8 "Ru I", s. Abb. 15). Ruscus-Extrakt reduziert also auch den durch Etacrynsäure gestelgerten Flüssigkeitsübertritt.

4.1.2.2.2. Zum Wirkungsmechanismus

Wird Ruscus-Extrakt in die Venenwand eingebaut?

Ruscus-Extrakt gehört als Saponin zu den Detergenzien, welche oberflächenaktiv sind. Dringt es gar intravasal durch das Endothel bzw. extravasal durch Adventitia und Media in das Venengewebe ein?

Um diese Frage zu beantworten, entfernten wir den Ruscus-Extrakt in den einzelnen Experimenten sowohl bei den ungeschädigten, als auch bei den

Versuchsablauf	Kontrolle		Ru I		Ru II		Ru II		Ru IV	
	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.
Krebs i.+e.vas. (15 min)	+	+	+ Ru i.+e.vas.		+ Ru i.+e.vas.		+ Ru i.+e.vas.		+ Ru i.+e.vas.	
Ausspülen mit Krebs i. + e.vas. (20 min.)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Krebs i. + e.vas. (2.5 min.)	+	+Eta	+Eta i.vas. + Ru i.+ e.vas.		+Eta i.vas. + Ru e.vas.		+Eta i.vas.		+Eta i.vas.	
Protein bzw. Evansblau i.vas.unter p= 30 cm Wasser (5min) Krebs e.vas.	+	+	+ Ru e.vas.		+ Ru e.vas.		+	+	+	+

Tab.7 : Einfluß von Ruscus-Extrakt (0.005 %ig) auf die Protein- bzw. Evansblau-permeabilität der Venen

"unge": ungeschädigt, "ge": geschädigt, "i.vas." : intravasal, "e.vas." : extravasal, "Eta": Etacrynsäure

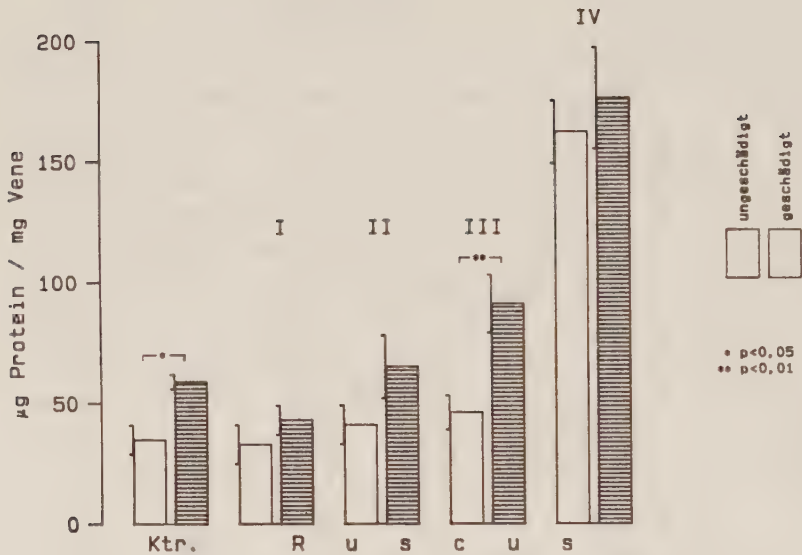


Abb.14 Einfluß von Ruscus-Extrakt (Saponingehalt: 0.005 %) auf den Proteinübertritt in die Venen

Versuchsablauf:

1. Pharmakongabe, 15 min: — Kontrollen: Krebs i.+e.vas.

Ru I,II,III, IV: Ruscus i.+e.vas.

2. Ausspülen des Pharmakons, 20 min: — bei Ru IV

3.(2.) Schädigungsphase, 2.5 min:

ungeschädigte Venen: — Kontrollen: Krebs i.+e.vas., Ru I: Ruscus i.+e.vas., Ru II: Krebs i.vas., Ruscus e.vas., Ru III + IV: Krebs i.+e.vas.

geschädigte Venen: - Kontrollen: Etacryns. (0.1%) i.vas., Krebs e.vas., Ru I: Ruscus + Etacryns. (0.1%) i.vas., Ruscus e.vas., Ru II: Etacryns. (0.1%) i.vas., Ruscus e.vas., Ru III + IV: Etacryns. (0.1%) i.vas., Krebs e.vas.

4. (3.) Protein (6%)applikation, 5 min: - unter Druck von 30 cm H₂O i.vas.

- Kontrollen, Ru III, IV: Krebs e.vas., Ru I+II: Ruscus e.vas.

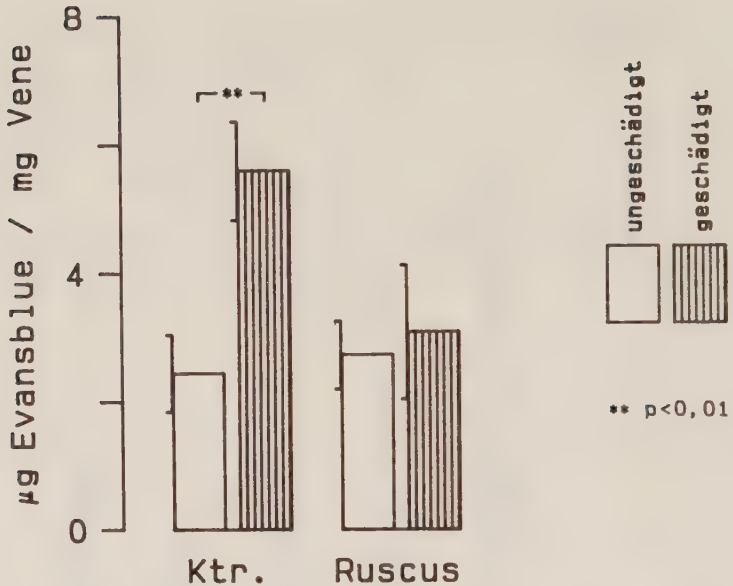


Abb.15 Einfluß von Ruscus-Extrakt (Saponingehalt: 0.005 %) auf den Flüssigkeitsübertritt in die Venen

Versuchsablauf:

1. Pharmakongabe, 15 min: — Kontrollen: Krebs i. + e.vas.

Verumexp.: Ruscus i.+ e.vas.

2. Schädigungsphase, 2.5 min:

ungeschädigte Venen: — s.l.

geschädigte Venen: — Kontrollen: Etacryns.(0.1 %) i.vas., Krebs e.vas.

Verumexp.: Ruscus + Etacryns. (0.1%) i.vas.,
Ruscus e.vas.

3.Evansblue (0.012%)applikation, 5 min: — unter Druck von 30 cm H₂ O i.vas.

— Kontrollen: Krebs e.vas.

— Verumexp.: Ruscus e.vas.

geschädigten Gefäßen nach vorheriger Applikation schrittweise extra- bzw. intravasal aus dem Organbad. (s. Abb. 14, Tab. 7: "Ruscus" bzw. "Ru" I, II, III, IV")

Nach 15-minütiger Applikation war bei Ru II der Ruscus-Extrakt intravasal, bei Ru III auch extravasal nicht mehr anwesend, bei Ru IV wurde er 20 min mit Krebslösung ausgespült. In allen 3 Versuchsreihen war der Proteingehalt sowohl der ungeschädigten, als auch der geschädigten Gefäße im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Er betrug bei Ru II 41 (ungeschädigt) bzw. 65 (geschädigt), bei Ru III 46 (ungeschädigt) bzw. 91 (geschädigt), bei Ru IV 162 (ungeschädigt) bzw. 176 (geschädigt) μg Protein/ mg Vene. (s. Tab. 8). Um so weitgehender der Ruscus-Extrakt also nach anfänglicher Applikationszeit entfernt wurde, desto mehr Protein gelangte in die Gefäßwand.

Tab. 8

Einfluß von Ruscus-Extrakt (Saponingehalt: 0.005%) auf den Protein- bzw. Flüssigkeitsübertritt in die Venen

	Kontrolle		Ru I		RuII		Ru III		RuIV	
	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.
n:	10	6	11	8	7	7	10	11	5	5
Protein	35	59	33	43	41	65	46	91	162	176
(µg/mg Vene)										
SE:	6	3	8	6	8	13	7	12	13	21
p:	└┐ 0.01 *		└┐ n.s.		└┐ n.s.		└┐ 0.004 **		└┐ n.s.	
n:	16	12	6	6						
Evansblue	2.44	5.6	2.73	3.08						
(µg/mg Vene)										
SE	0.6	0.8	0.5	1						
p:	└┐ 0.003 **		└┐ n.s.							

"unge.": ungeschädigt, "ge.": geschädigt

SE: Standarderror

p: Signifikanz

Erklärung zu "Ru I, II, III, IV" s.Text und Tab.7

Ruscus-Extrakt bindet also so fest an die Venen, daß er gleichsam Lücken hinterläßt, wenn er entfernt wird.

4.1.2.3. HR

4.1.2.3.1. Ödemprotektive Wirkung

Als optimal-ödemprotektive Konzentration für HR ermittelten Felix et al. (1983) 0.05 %.

Wir applizierten es den Ohrrendvenen in dieser Konzentration in der gleichen Art wie TMHC und Ruscus-Extrakt (Ru I)(s.Tab.9 HR-15 min).

Die Proteinpermeabilität für die ungeschädigten Gefäße (14 µg) wurde im Gegensatz zu den ungeschädigten Kontrollen nicht gesteigert (14 µg Protein/mg Vene). Die Durchlässigkeit für Eiweiß der geschädigten Gefäße (21 µg Protein/mg Vene) differierte nicht signifikant von derjenigen der ungeschädigten Venen (14 µg Protein/mg Vene). (s. Tab. 10, Abb.16) Es gelten ab hier wieder die neuen Kontrollen.

Versuchsablauf	Kontrolle		HR_15 min		HR 60 min	
	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.
Krebs i.+e.vas. (15 min)	+	+	+ HR i.+e.vas.			
Krebs i.+e.vas. (60 min)					+ HR i.+e.vas.	
Krebs i.+e.vas. (2.5 min)	+	+ Eta i.vas.	+ HR i.+e.vas. + Eta i.vas.		+ HR i.+e.vas. + Eta i.vas.	
Protein i.vas. unter p=30 cm Wasser (5 min)	+	+	+ HR e.vas.		+ HR e.vas.	
Krebs e.vas.						

Tab.9 : Proteinübertritt in die Venen nach 15- bzw. 60-minütiger Gabe von HR (0.05 %ig)

"unge": ungeschädigt, "ge": geschädigt, "Eta": Etacrynsäure, "i.vas.": intravasal, "e.vas.": extravasal

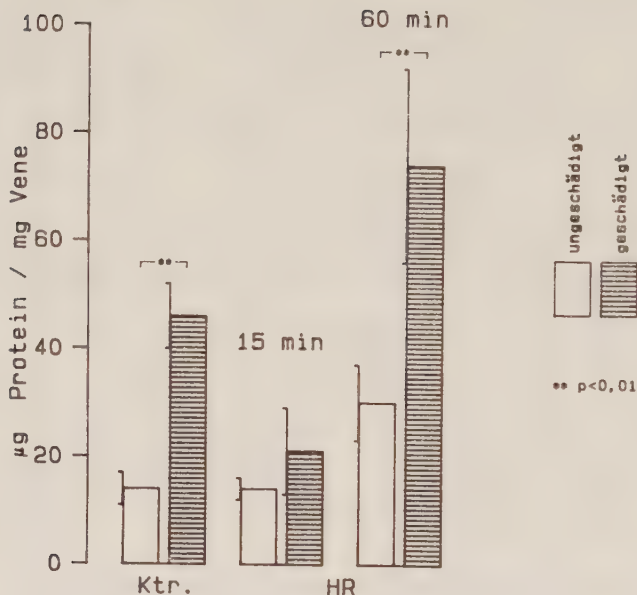


Abb. 16 Proteinübertritt in die Venen nach 15-bzw. 60-minütiger Gabe
von HR (0.05 %)

Versuchsablauf:

1. Pharmakongabe — Kontrollen: Krebs 60 min i.+e.vas., "HR 15 min": HR
15 min i.+e.vas., "HR 60 min": HR 60 min i.+e.vas.

2. Schädigungsphase, 2.5 min:

ungeschädigte Venen — s.1.

geschädigte Venen: — Kontrollen: Etacryns. (0.1%) i.vas., Krebs
e.vas., "HR 15 bzw. 60 min": HR + Etacryns.
(0.1%) i.vas., HR e.vas.

3. Protein (6%) applikation, 5 min — unter Druck von 30 cm H₂O i.vas.

Kontrollen: Krebs e.vas., "HR 15 bzw. 60
min": HR e.vas.

Tab. 10

Proteinübertritt in die Venen nach 15 - bzw. 60-minütiger Gabe von HR (0.05 %)

	Kontrolle		HR			
	unge.	ge.	15		60 min	
	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.
n:	7	7	8	8	15	5
Protein	14	46	14	21	30	74
(µg/mg Vene)						
SE:	3	6	2	8	6	18
p:	└─┐ 0.00 ***		└─┐ n.s.		└─┐ 0.006 **	

"unge": ungeschädigt, "ge": geschädigt

SE: Standarderror

p: Signifikanz

Damit lag für HR (0.05%) bei einer Einwirkzeit von 15 min und bei gleichzeitiger Applikation mit Etacrynsäure ein ödemprotektiver Effekt auf die isolierte Ohrrendvene vor.

4.1.2.3.2. Zum Wirkungsmechanismus

Bei einer Einwirkzeit von 60 min (s. Tab. 9) erhöhte HR (0.05 %) die Permeabilität sowohl der ungeschädigten, als auch der geschädigten Gefäße (s. Tab. 10). Dasselbe Phänomen trat auf, wenn die Venen 60 min einer Ca^{++} -freien Krebslösung ausgesetzt waren (s. Tab. 11, 12, Abb. 17).

Fängt HR also Ca^{++} -Ionen ab?

Wir führten Versuche mit HR (0.05 %) durch, bei denen wir jeweils den Ca^{++} -Gehalt variierten (s. Tab. 11). So war die Proteinpermeabilität bei 60-minü-

Versuchsablauf	Kontrolle Krebs			HR	
	3f. Ca^{++}	normal	Ca^{++} -frei	3f. Ca^{++}	Ca^{++} -frei
Krebs (3f. Ca^{++}) i.e.v.as. (60 min.)	+			+ HR i.e.v.as.	
Krebs i.e.v.as. (60 min.)		+		+HR i.e.v.as.	
Krebs (Ca^{++} -frei) i.e.v.as. (60 min.)			+		+ HR i.e.v.as.
Proteinübertritt unter p=30 cm Wasser i.v.as. (5 min.) entspr. Krebsalg. e.v.as.	+	+	+	+ HR e.v.as.	+ HR e.v.as.

Tab.11: Proteinübertritt in die ungeschädigten Venen bei abgeschalteter Perfusion unter dem Einfluß verschiedener Ca^{++} -Konzentrationen der HR-Lösung (0.05 %lg)
 "i.v.as.": intravasal, "e.v.as.": extravasal, "Eta": Etacrynsäure

tiger Einwirkzeit von HR in normaler bzw. Ca^{++} -freier Krebslg. auf 30 bzw. 24 μg Protein/mg Vene erhöht. (Tab. 12, Abb.17)

Bei HR in Krebslösung mit 3facher Ca^{++} -Ionen Konzentration war sie gegenüber den Kontrollen in normaler Krebslösung nicht gesteigert. Die Kontroll-experimente zeigten eine Permeabilität von 27 μg Protein/mg Vene (Ca^{++} -freie Krebslösung) bzw. 14 μg Protein/ mg Vene (n. Krebslösung, Krebslösung mit 3facher Ca^{++} -Konzentration (s.Tab. 11,12, Abb.17)

Wie beeinflusst die Zufuhr von neuen Ca^{++} -Ionen die erhöhte Permeabilität von HR nach 60-minütiger Einwirkzeit?

Die P e r f u s i o n der ungeschädigten Venen mit HR (in normaler Krebslösung) und HR (in Ca^{++} -freier Krebslösung) bzw. mit normaler Krebslösung und Ca^{++} -freier Krebslösung sollten dies klären.

Bei Perfusion mit normaler Krebslösung gelangten 23 μg Protein/mg Vene und beim Durchströmen mit Ca^{++} -freier Krebslösung 46 μg Protein/ mg Vene in die Vene. Der Unterschied war damit statistisch signifikant.

Das Perfundieren mit HR (0.05%) steigerte die Permeabilität nicht merklich (25 μg Protein/ mg Vene); das Durchströmen mit HR in Ca^{++} -freier Lösung erhöhte sie jedoch (38 μg /mg Vene) (s. Tab.13, Abb.18)

Somit verstärkt HR—bei 60-minütiger Applikation—die Proteinpermeabilität der ungeschädigten Venen nicht, wenn dauernd frische Ca^{++} -Ionen zur Verfügung stehen.

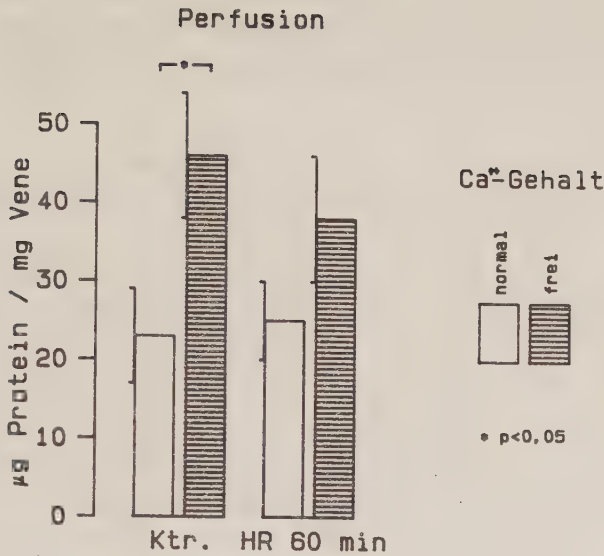


Abb.18 Proteinübertritt in die ungeschädigten Venen bei Perfusion unter dem Einfluß verschiedener Ca⁺⁺-Konzentrationen der HR (0.05%)-Lösung

Versuchsablauf:

1. Pharmakongabe, 60 min – Kontrollen: "norm. Ca⁺⁺": norm. Krebs, Ca⁺⁺-fr.: Ca⁺⁺-fr. Krebs, jew. i.+e.vas.
bei Perfusion – Verumexp.: "norm. Ca⁺⁺": norm. HR, "Ca⁺⁺-fr.": Ca⁺⁺-fr. HR, jew. i.+e.vas.
2. Schädigungsphase, 2.5 min – da alle ungeschädigt, s. 1.
bei Perfusion
3. Protein(6%)applikation, 5 min – unter Druck von 30 cm H₂O i.vas.,
bei abgeschalt. Perfusion extravasal s. 1

Tab. 12

Proteinübertritt in die ungeschädigten Venen bei abgeschalteter Perfusion unter dem Einfluß verschiedener Ca^{++} -Konzentrationen der HR (0.05 %)-Lösung

	Kontrolle			HR 60 min		
	3f. Ca^{++}	n. Ca^{++}	Ca^{++} -fr. 3	3f. Ca^{++}	n. Ca^{++}	Ca^{++} -fr.
n:	6	7	7	8	9	10
Protein	14	14	27	14	30	24
($\mu\text{g}/\text{mg}$ Vene)						
SE	8	3	5	2	7	6
p:		0.04		0.03		
		0.04				

3f.- Ca^{++} : 3fache Ca^{++} -Konzentration, n. Ca^{++} : normale Ca^{++} -Konzentration, Ca^{++} -fr.: Ca^{++} -frei

SE: Standarderror

p: Signifikanz

Tab. 13

Proteinübertritt in die ungeschädigte Vene bei Perfusion unter dem Einfluß verschiedener Ca^{++} -Konzentrationen der HR (0.05 %)-Lösung

	Kontrolle		HR 60 min	
	n. Ca^{++}	Ca^{++} -fr.	n. Ca^{++}	Ca^{++} -fr.
n:	7	7	7	7
Protein	23	46	25	38
($\mu\text{g}/\text{mg}$ Vene)				
SE:	6	8	5	9
p:	0.02 **		n.s.	

n. Ca^{++} : normale Ca^{++} -Konzentration, Ca^{++} -fr. : Ca^{++} -frei

SE: Standarderror

p: Signifikanz

4.1.2.4. Aescin

4.1.2.4.1. Ödemprotektive Wirkung

Für die ödemprotektive Wirkung von Aescin mußte eine günstige Konzentration erst gefunden werden.

Bei der isolierten Ohrrendvene wurde Aescin in einer Konzentration von 0.0025, 0.01 bzw. 0.1 % erprobt. (s.Tab.14, Abb.19 Aescin I,II,III) 0.0025 bzw. 0.01 %iges Aescin, 15 min intravasal appliziert, beeinflusste die Durchlässigkeit der ungeschädigten Venen im Vergleich zu den ungeschädigten Kontrollen nicht. Der Proteingehalt betrug jeweils 13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Vene.

0.1 %iges Aescin steigerte die Permeabilität der ungeschädigten Venen auf 41 μg Protein/mg Vene (s.Tab. 15, Abb. 19).

Die durch Etacrynsäure erhöhte Proteindurchlässigkeit konnte durch 0.0025, 0.01 und 0.1 %iges Aescin nicht gemindert werden. Es gelangten 57 (0.0025 %iges Aescin), 47 (0.01 %iges Aescin) bzw. 45 (0.1 %iges Aescin) μg Protein/mg Vene in die Gefäßwand. (Gesch. Kontrolle: 46 μg Protein/mg Vene). Bei 0.0025 bzw. 0.01 %igem Aescin verhielten sich die geschädigten zu den ungeschädigten Gefäßen statistisch signifikant unterschiedlich. ($p=0.04$ bei 0.0025 %igem Aescin bzw. 0.003 bei 0.1 %igem Aescin).

Aescin, 15 min i.vas appliziert, schützt also weder in den Konzentrationen von 0.0025, 0.01 bzw. 0.1 % vor einer gesteigerten Proteinpermeabilität. Auf die Durchlässigkeit der Venen für niedermolekulare Flüssigkeit übt Aescin (0.0025 %ig), 15 min intravasal verabreicht, keinen Einfluß aus, vermag jedoch ihre künstlich gesteigerte Permeabilität zu reduzieren (s.Abb

Versuchsablauf	Kontrolle		Aescin I (0.0025%)		Aescin II (0.01%)		Aescin III (0.1%)		Aescin IV (0.0025%)	
	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.	unge.	ge.
Krebs i. + e. vas. (15 min)	+	+	+Aescin i. vas.		+Aescin i. vas.		+Aescin i. vas.		+Aescin i. vas.	
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Ausspülen mit Krebs i. + e. vas. (20 min.)	+	+ Eta i. vas.	+Eta i. vas. +Aescin i. vas.		+Eta i. vas. +Aescin i. vas.		+ Eta i. vas. +Aescin i. vas.		+	+Eta i. vas.
Protein bzw. Evansblue i. vas. unter p=30 cm Wasser (5 min) Krebs e. vas.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab.14: Einfluß von Aescin auf die Protein- bzw. Flüssigkeitspermeabilität der Venen.

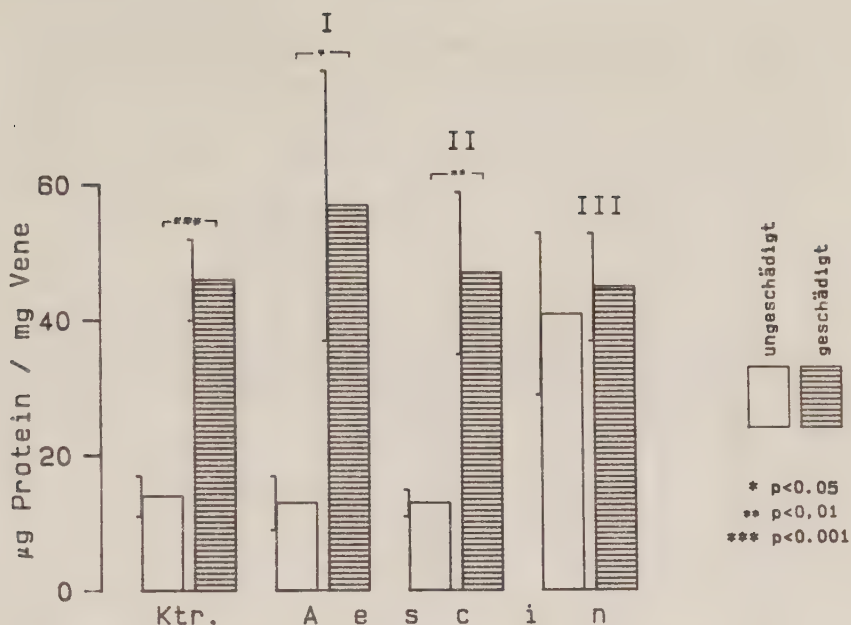


Abb.19 Einfluß von Aescin auf die Proteinpermeabilität der Venen

Versuchsablauf:

1. Pharmakongabe, 15 min — Kontrollen: Krebs i.+e.vas.

— Verumexp.: Aescin i.vas., Krebs e.vas. (Aescin bei Aescin I, 0.0025 %ig, bei II 0.01 %ig, bei III 0.1 %ig)

2. Schädigungsphase, 2.5 min

ungeschädigte Venen — s. 1.

geschädigte Venen — Kontrollen: Etacryns. (0.1 %) i.vas., Krebs e.vas.

— Verumexp.: Aescin + Etacryns.(0.1 %) i.vas., Krebs e.vas. (Aescin I, II, III s. 1.)

3. Protein(6 %)applikation, 5 min — unter Druck von 30 cm H₂O i.vas., Krebs e.vas.

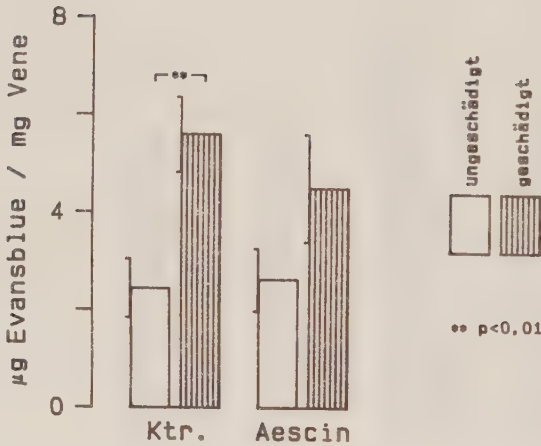


Abb.20 Einfluß von Aescin (0.0025 %) auf die Flüssigkeitspermeabilität der Venen

Versuchsablauf:

1. Pharmakongabe, 15 min – Kontrollen: Krebs i.+e.vas.
Verumexp.: Aescin i.vas., Krebs e.vas.
2. Schädigungsphase, 2.5 min –
ungeschädigte Venen – s.l.
geschädigte Venen – Kontrollen: Etacryns. (0.1 %) i.vas., Krebs e.vas.
– Verumexp.: Aescin + Etacryns.(0.1 %) i.vas., Krebs e.vas.
3. Evansblue (0.012 %)applikation, 5 min – unter Druck von 30 cm H₂O
i.vas., Krebs e.vas.

20, Tab.15). Es traten 2.63 µg Evansblue/mg Vene (Ktr.: 2.44 µg Evansblue/-mg Vene) und 4.5 µg Evansblue/mg Vene (Ktr.: 5.6 µg Evansblue/mg Vene) in die geschädigten Venen über. Der Unterschied im Evansbluegehalt zwischen geschädigten und ungeschädigten Gefäßen erwies sich nicht als signifikant. Ein ödemprotektiver Effekt lag vor.

Tab. 15

Einfluß von Aescin auf die Protein- bzw. Flüssigkeitspermeabilität der Venen

	Kontrolle		Aescin					
	unge	ge	0.0025%		0.01%		0.1%	
	unge	ge	unge	ge	unge	ge	unge	ge
n:	7	7	8	8	10	7	10	5
Protein	14	46	13	57	13	47	41	45
(µg/mg Vene)								
SE:	3	6	4	20	1	12	12	8
p:	└─ 0.0 ─┐ ***		└─ 0.04 ─┐		└─ 0.003 ─┐		└─ n.s. ─┐	
n:								
Evansblue	2.44	5.6	2.63	4.5				
(µg/mg Vene)								
SE:	0.6	0.8	0.6	1.1				
p:	└─ 0.003 ─┐ **		└─ n.s. ─┐					

"unge": ungeschädigt, "ge": geschädigt

SE: Standarderror

p: Signifikanz

4.1.2.4.2. Zum Wirkungsmechanismus

Geht Aescin – welches zu derselben chemischen Gruppe gehört wie der Ruscus-Extrakt, nämlich den Saponinen – wie dieser Wechselwirkungen mit dem Endothel ein ?

Diese Frage sollten Experimente klären, bei denen Aescin (Aescin IV) nach vorheriger Applikation 20 min ausgespült wurde (s.Tab.14)

Dadurch wurde sowohl die Proteinpermeabilität der ungeschädigten Venen gesteigert (24 µg Protein/mg Vene gegenüber 14 µg Protein/mg Vene in den Kontrollen), als auch die der geschädigten Gefäße (58 µg Protein/mg Vene gegenüber 46 µg Protein/ mg Vene) (Abb. 21, Tab.16)

Tab. 16

Einfluß von Aescin (0.0025 %) auf die Proteinpermeabilität der Venen, wenn das Pharmakon wieder ausgespült wird

	Kontrolle		Aescin (0.0025 %), 20 min ausgespült	
	unge.	ge.	unge.	ge.
n:	7	7	9	9
Protein (µg/mg Vene)	14	46	24	58
SE:	3	6	4	9
p:				

"unge": ungeschädigt, "ge": geschädigt

SE: Standarderror

p:Signifikanz

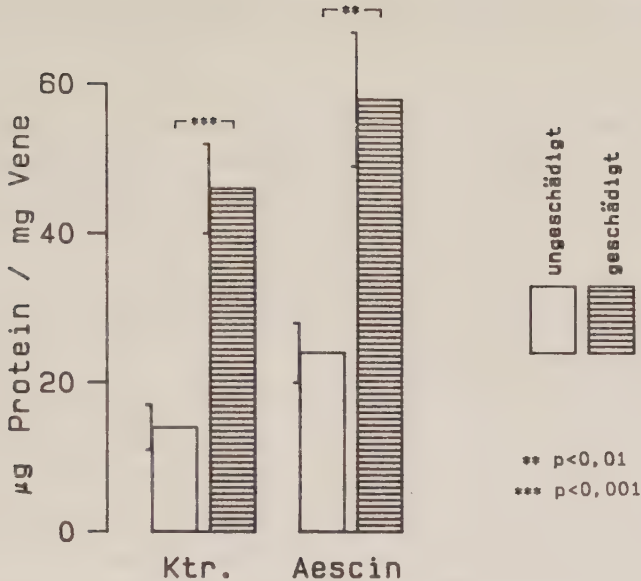


Abb.21 Einfluß von Aescin (0.0025 %) auf die Proteinpermeabilität der Venen, wenn das Pharmakon wieder ausgespült wird.

Versuchsablauf:

1. Pharmakongabe, 15 min
 - Kontrollen: Krebs i.+e.vas.
 - Verumexp.: Aescin i.vas., Krebs e.vas.
2. Bei den Verumexperimenten wird Aescin 20 min durch wiederholte Krebsapplikation ausgespült.
3. (2.) Schädigungsphase, 2.5 min
 - ungeschädigte Venen: - Kontrollen, Verumexp.: Krebs i.+e.vas.
 - geschädigte Venen: - Kontrollen, Verumexp.: Etacryns. (0.1%) i.vas., Krebs e.vas.
- 4.(3.) Protein(6%)applikation, 5 min - unter einem Druck von 30 cm H₂O i.vas., Krebs e.vas.

4.1.3. Dünnschichtchromatographie von TMHC, Ruscus-Extrakt, HR und Aescin

Für TMHC, Ruscus-Extrakt und HR war ein ödemprotektiver Effekt auf die isolierte Ohrrendvene festgestellt worden, wenn sie gleichzeitig mit Etacrynsäure verabreicht wurden. Komplexieren die Pharmaka die Etacrynsäure chemisch und inaktivieren sie dadurch?

Sollte letzteres der Fall sein, so müßte eine Dünnschichtchromatographie (DC) die reinen Ödemprotektiva anders auftrennen als jeweils ein Gemisch aus dem Pharmakon und Etacrynsäure.

Zur DC wurden Kieselgelfolien verwendet; als Fließmittel diente im Falle von TMHC und HR einerseits n-Butanol-Methanol-Wasser (10:1:3), andererseits Äthylacetat-Ameisensäure-Eisessig-Wasser (100:11:11:27), im Falle von Ruscus-Extrakt und Aescin Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10). Die ersten zwei Chromatogramme wurden nach Neu (1957) angefärbt. Im folgenden sollen TMHC und HR bzw. Ruscus-Extrakt und Aescin gemeinsam behandelt werden.

Reines TMHC und das TMHC-Etacrynsäure-Gemisch zeigten sowohl in n-Butanol-Methanol-Wasser, als auch in Äthylacetat-Ameisensäure-Eisessig-Wasser für alle Komponenten gleiche R_f -Werte (s. Tab. 17, Abb. 22 und Tab. 18, Abb. 23). Die einzelnen Flecken waren gelb und violett (Auftrennung in n-Butanol-Methanol-Wasser) bzw. hellblau, gelb und weiß (Auftrennung in Äthylacetat-Ameisensäure-Eisessig-Wasser). Im ersten Fließmittel wurde auch Etacrynsäure (0.1 %) durch eine (violette) Bande mit dem R_f -Wert von 0.35 sichtbar; diese überlagerte in dem Etacrynsäure (0.1 %)-TMHC-Gemisch einen gleichfarbigen Fleck von TMHC. Daß die entsprechende Bande in der Spur von reiner Etacrynsäure in der 10-fachen Konzentration von 1% und dem Etacrynsäure (1%)-TMHC-Gemisch einen etwas höheren R_f -Wert (0.37 bzw. 0.36) aufweist, liegt daran, daß sie natürlich größer war und im Mittel weiter gewandert ist.

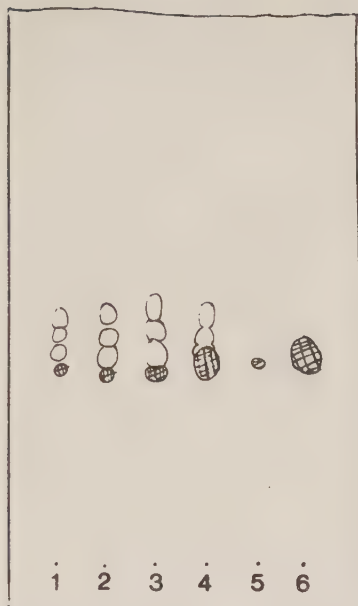


Abb.22: Dünnschichtchromatographie von reinem TMHC und TMHC-
Etacrynsäure-Gemisch auf Kieselgelfolie 60 F₂₅₄
Fließmittel: n-Butanol-Methanol-Wasser (10:1:3)

Aufgetragen wurde von links nach rechts :

- | | |
|--|---------|
| 1. TMHC (0.5 %ig) | : 10 µl |
| 2. TMHC (0.5 %ig) + Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 3. TMHC (0.5 %ig) + Etacrynsäure (1 %ig) | : 10 µl |
| 4. Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 5. Etacrynsäure (1 %ig) | : 10 µl |

Angefärbt wurde nach Neu (1957)

 violett,  gelb.

Tab.17 Dünnschichtchromatographie von reinem TMHC und TMHC-
Etacrynsäure-Gemisch auf Kieselgelfolie 60 F₂₅₄
Fließmittel: n-Butanol-Methanol-Wasser (10:1:3)
R_f-Werte:

Spur				
1	2	3	4	5
0.44	0.46	0.45		
0.41	0.41	0.41		
0.38	0.37	0.38		
0.33	0.34	0.36	0.35	0.37

1. TMHC 0.5 %ig
2. TMHC 0.5 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig
3. TMHC 0.5 %ig + Etacrynsäure 1 %ig
4. Etacrynsäure 0.1 %ig
5. Etacrynsäure 1 %ig

Laufzeit: 6 Stunden

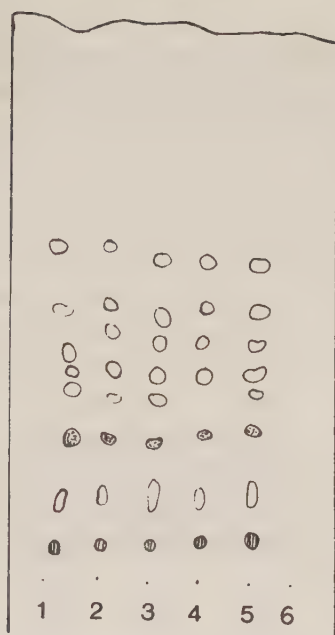


Abb.23: Dünnschichtchromatographie von reinem TMHC und TMHC-
Etacrynsäure-Gemisch auf Kieselgelfolie 60 F₂₅₄
Fließmittel: Äthylacetat-Amelnsäure-Eisessig-Wasser
(100:11:11:27)

Aufgetragen wurden von links nach rechts:

- | | |
|---|---------|
| 1. TMHC (0.25 %ig) | : 10 µl |
| 2. TMHC (0.25 %ig) + Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 3. TMHC (0.5 %ig) + Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 4. TMHC (0.25 %ig) + Etacrynsäure (1 %ig) | : 10 µl |
| 5. TMHC (0.5 %ig) + Etacrynsäure (1 %ig) | : 10 µl |
| 6. Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |

Angefärbt wurde nach Neu (1957)

○ blau, ● gelb, ▨ weiß.

Tab.18 Dünnschichtchromatographie von reinem TMHC und TMHC–

Etacrynsäure–Gemisch auf Kieselgelfolie 60 F₂₅₄

Fließmittel: Äthylacetat–Ameisensäure–Eisessig–Wasser

(100:11:11:27)

R_f–Werte

Spur					
1	2	3	4	5	6
0.53	0.53	0.57	0.57	0.57	
0.48	0.49	0.47	0.49	0.49	
0.41	0.44	0.42	0.42	0.42	
0.37	0.38	0.36	0.37	0.37	
0.33	0.33	0.32		0.34	
0.25	0.26	0.25	0.26	0.27	
0.13	0.15	0.15	0.14	0.15	
0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	

1. TMHC 0.25 %ig

2. TMHC 0.25 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig

3. TMHC 0.5 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig

4. TMHC 0.25 %ig + Etacrynsäure 1 %ig

5. TMHC 0.5 %ig + Etacrynsäure 1 %ig

6. Etacrynsäure 0.1 %ig

Laufzeit: 4 Std.

Auch HR und das Gemisch aus HR und Etacrynsäure wanderten jeweils zu derselben Stelle, und zwar sowohl in n-Butanol–Methanol–Wasser, als auch in Äthylacetat–Ameisensäure–Eisessig–Wasser. (s.Tab. 19, 20, Abb. 24, 25); zusätzlich tauchte jedoch im ersten Chromatogramm wie bei der

TMHC–Auftrennung die Etacrynsäure als eigenständiger Fleck auf. Ihr Platz war in der Spur von HR–Etacrynsäure bereits besetzt.

Es ist äußerst unwahrscheinlich, daß eine Komponente von TMHC bzw. HR und ein potentieller Komplex aus Etacrynsäure und TMHC bzw. HR zu derselben Stelle wandern. Das in beiden Fließmitteln somit gleiche Auftrennungsmuster von TMHC bzw. HR und dem TMHC (HR)– Etacrynsäure–Gemisch läßt darauf schließen, daß TMHC bzw. HR mit Etacrynsäure nicht chemisch reagiert.

Tab. 19 Dünnschichtchromatographie von reinem HR und HR–Etacrynsäure–Gemisch auf Kieselgelfolie 60 F₂₅₄

Fließmittel: n–Butanol–Methanol–Wasser (10:1:3)

R_F–Werte.

Spur					
1	2	3	4	5	6
0.31	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
	0.26	0.26	0.26	0.25	0.25
	0.17	0.16	0.15	0.16	0.16
	0.10	0.09	0.07	0.09	0.09
	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06

1: Etacrynsäure 0.1 %ig

2: HR 0.5 %ig

3: HR 0.25 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig

4: HR 0.5 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig

5: HR 0.5 %ig + Etacrynsäure 1 %ig

6: HR 0.25 %ig + Etacrynsäure 1 %ig

Laufzeit: 6 Stunden

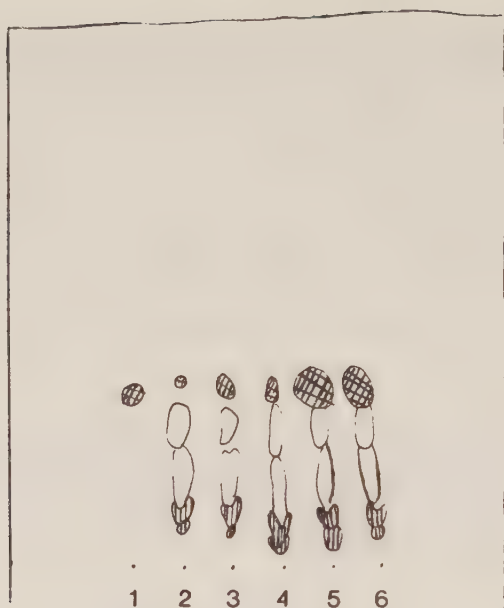


Abb. 24: Dünnschichtchromatographie von reinem HR und HR-Etacrynsäure-Gemisch auf Kieselgelfolien 60 F₂₅₄

Fließmittel: n-Butanol-Methanol-Wasser (10:1:3)

Aufgetragen wurden von links nach rechts:

- | | |
|---|---------|
| 1. Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 2. HR (0.5 %ig) | : 10 µl |
| 3. HR (0.25 %ig) + Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 4. HR (0.5 %ig) + Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 5. HR (0.5 %ig) + Etacrynsäure (1 %ig) | : 10 µl |
| 6. HR (0.25 %ig) + Etacrynsäure (1 %ig) | : 10 µl |

Angefärbt wurde nach Neu (1957)

 violett,
  gelb,
  weiß.

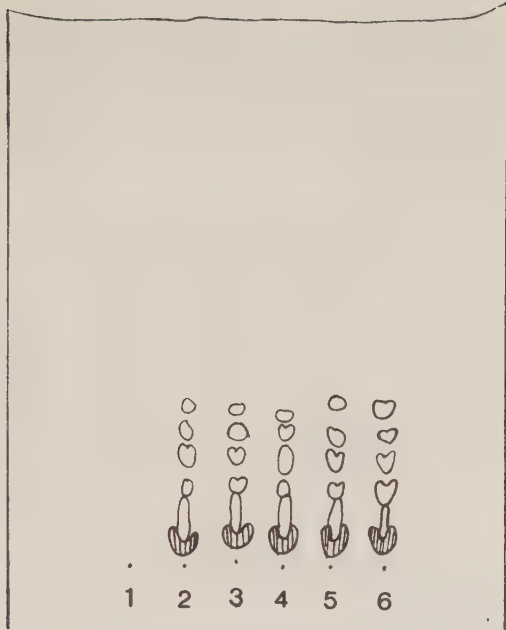


Abb.25: Dünnschichtchromatographie von reinem HR und HR-Etacrynsäure-Gemisch auf Kieselgelfolie 60 F₂₅₄
Fließmittel: Äthylacetat – Ameisensäure – Eisessig – Wasser
(100:11:11:27)

Aufgetragen wurden von links nach rechts:

- | | |
|---|---------|
| 1. Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 2. HR (0.5 %ig) | : 10 µl |
| 3. HR (0.25 %ig) + Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 4. HR (0.5 %ig) + Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 5. HR (0.5 %ig) + Etacrynsäure (1 %ig) | : 10 µl |
| 6. HR (0.25 %ig) + Etacrynsäure (1 %ig) | : 10 µl |

Angefärbt wurde nach Neu (1957)

○ blau, ⊗ weiß.

Tab.20

Dünnschichtchromatographie von reinem HR und HR-Eta-
crynsäure-Gemisch auf Kieselgelfolie 60 F₂₅₄

Fließmittel: Äthylacetat — Ameisensäure — Eisessig — Wasser
(100:11:11:27)

R_f— Werte.

Spur					
1	2	3	4	5	6
	0.29	0.28	0.28	0.3	0.3
	0.24	0.24	0.24	0.23	0.24
—	0.2	0.19	0.19	0.19	0.19
	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
	0.08	0.09	0.09	0.08	0.09
	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04

1: Etacrynsäure 0.1 %ig

2: HR 0.5 %ig

3: HR 0.25 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig

4: HR 0.5 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig

5: HR 0.5 %ig + Etacrynsäure 1 %ig

6: HR 0.25 %ig + Etacrynsäure 1 %ig

Laufzeit: 4 Stunden

Auch Ruscus-Extrakt und Ruscus-Extrakt-Etacrynsäure zeigten — abgesehen von einer (in der Spur von Ruscus— 0 . 1 %iger Etacrynsäure) zusätzlichen Bande mit dem R_f —Wert von 0.6 bzw. zwei weiteren Flecken (in der Spur von Ruscus—1 %iger Etacrynsäure) mit dem R_f —Wert von 0.6 bzw. 0.2 gleiche Auftrennung. (s.Tab.21, Abb.26)

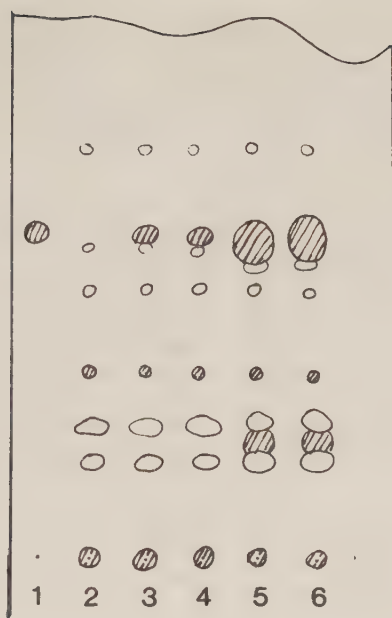


Abb.26 : Dünnschichtchromatographie von reinem Ruscus-Extrakt und
Ruscus-Extrakt-Etacrynsäure-Gemisch auf Kieselgelfolie
60 F₂₅₄
Fließmittel: Chloroform – Methanol – Wasser (64: 50: 10)

Aufgetragen wurden von links nach rechts:

- | | |
|--|---------|
| 1. Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 2. Ruscus-Extrakt (0.5 %ig) | : 10 µl |
| 3. Ruscus-Extrakt (0.5 %ig) + Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 4. Ruscus-Extrakt (0.7 %ig) + Etacrynsäure (0.1 %ig) | : 10 µl |
| 5. Ruscus-Extrakt (0.5 %ig) + Etacrynsäure (1 %ig) | : 10 µl |
| 6. Ruscus-Extrakt (0.7 %ig) + Etacrynsäure (1 %ig) | : 10 µl |

○ dunkelbraun ,

⊙ ocker

Tab.21

Dünnschichtchromatographie von reinem Ruscus-Extrakt und
Ruscus-Extrakt-Etacrynsäure-Gemisch auf Kieselgelfolie 60
F₂₅₄ Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)

Spur					
1	2	3	4	5	6
	0.76	0.78	0.76	0.76	0.78
0.6		0.61	0.6	0.57	0.62
	0.58	0.59	0.58	0.53	0.57
	0.49	0.51	0.51	0.5	0.51
	0.34	0.35	0.34	0.34	0.35
	0.23	0.24	0.24	0.25	0.26
				0.2	0.22
	0.17	0.17	0.18	0.17	0.18
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

1: Etacrynsäure 0.1 %ig

2: Ruscus-Extrakt 0.5 %ig

3: Ruscus-Extrakt 0.5 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig

4: Ruscus-Extrakt 0.7 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig

5: Ruscus-Extrakt 0.5 %ig + Etacrynsäure 1 %ig

6: Ruscus-Extrakt 0.7 %ig + Etacrynsäure 1 %ig

Laufzeit: 2 Stunden

Diese zusätzlichen Flecken stellen wohl reine Etacrynsäure dar, da der erste (R_f -Wert: 0.6) auch in der Spur von reiner 0.1 %iger Etacrynsäure und beide ebenfalls bei der Auftrennung von Aescin-Etacrynsäure (1 %ig), welche auf demselben Chromatogramm stattfand, auftauchten. (s.u. und Tab.22 und Abb. 27)

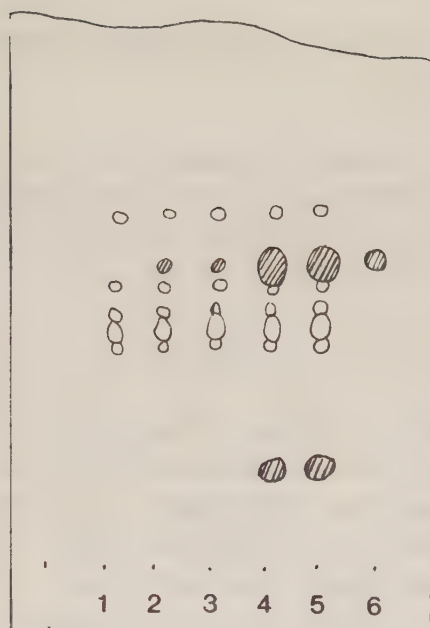


Abb.27 Dünnschichtchromatographie von reinem Aescin und Aescin-Etacrynsäure-Gemisch auf Kieselgelfolie 60 F₂₅₄
Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)

Aufgetragen wurden von links nach rechts:

- | | |
|---|---------|
| 1. Aescin 0.7 %ig | : 10 µl |
| 2. Aescin 0.35 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig | : 10 µl |
| 3. Aescin 0.7 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig | : 10 µl |
| 4. Aescin 0.35 %ig + Etacrynsäure 1 %ig | : 10 µl |
| 5. Aescin 0.7 %ig + Etacrynsäure 1 %ig | : 10 µl |
| 6. Etacrynsäure 0,1 %ig | : 10 µl |



dunkelbraun,



ocker

Ansonsten zeigten auch Aescin und Aescin-Etacrynsäure zeigten jeweils gleiche R_f -Werte.

Tab.22 Dünnschichtchromatographie von reinem Aescin und Aescin-Etacrynsäure-Gemisch auf Kieselgelfolie 60 F₂₅₄
Fließmittel: Chloroform– Methanol – Wasser (64: 50:10)
 R_f -Werte.

Spur					
1	2	3	4	5	6
0.64	0.65	0.65	0.68	0.69	
	0.56	0.56	0.57	0.59	0.6
0.52	0.51	0.52	0.53	0.54	
0.46	0.47	0.48	0.48	0.49	
0.43	0.43	0.44	0.45	0.46	
0.4	0.4	0.41	0.42	0.42	
			0.19	0.19	

1: Aescin 0.7 %ig

2: Aescin 0.35 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig

3: Aescin 0.7 %ig + Etacrynsäure 0.1 %ig

4: Aescin 0.35 %ig + Etacrynsäure 1 %ig

5: Aescin 0.7 %ig + Etacrynsäure 1 %ig

6: Etacrynsäure 0.1 %ig

Laufzeit: 2 Stunden

Da dieses Ergebnis so eindeutig war, verzichteten wir für Ruscus-Extrakt und Aescin auf eine weitere Chromatographie in einem anderen Fließmittel. Es ist also der Beweis erbracht, daß auch weder Ruscus-Extrakt, noch Aescin die Etacrynsäure komplexieren.

4.2. Zur Wirkung von Aescin auf das Etacrynsäureödem am Hinterlauf der Katze

Ob Aescin, wenn man es oral verabreicht, in bezug auf das interstitielle morphologische Ödem protektiv wirkt, sollte am Hinterlauf der Katze getestet werden.

Zu diesem Zweck wurde eine Extremität ("Ödembein") strömungskonstant perfundiert und – wie bei den *in-vitro*-Versuchen – durch intravasale Applikation der Etacrynsäure geschädigt. Der zweite Hinterlauf ("Kontrollbein") diente als Referenz.

Bei beiden Extremitäten unterschieden wir – analog dem Gefäßwandödem – zwischen Eiweiß- und –Flüssigkeitspermeabilität ; letzteres wurde hier jedoch direkt anhand des Wasserübertritts gemessen. Wasser- und Eiweißpassage wurde jeweils getrennt für Haut- und Muskelproben untersucht. Das Flüssigkeits- bzw. Proteinödem konnte – im Gegensatz zu den Schweineohrvenen – direkt aus der Differenz der Flüssigkeits- bzw. Proteinpermeabilität von Haut und Muskel zwischen "Ödem"- und "Kontroll"bein gemessen werden.

Zusätzlich registrierten wir während des gesamten Versuches den systemischen Blutdruck , den "arteriellen Perfusionsdruck" als Maß für den Arteriolentonus, und das Venenvolumen.

Zunächst wurde unter Kontrollbedingungen ein Ödem erzeugt, dann studierten wir, ob Aescin die Ödementwicklung hemmt.

4.2.1. Protein- und Flüssigkeitsgehalt des Ödems

4.2.1.1. Kontrollversuche

Die intravasale Applikation der Etacrynsäure schädigte das Gefäßendothel bei einer Einwirkzeit von 10 min so stark, daß ein starkes eiweißreiches Ödem entstand.

Der Gehalt an Ödemprotein bzw. Ödemwasser ergab sich aus der Differenz der Protein- und Wassermenge zwischen "Ödem"- und "Kontroll"bein 45 Minuten nach Etacrynsäureperfusion.

Die Proteinpermeabilität in der Haut des "Ödembeines" betrug 4.9 mg/g Trockengewebe im Vergleich zu 3.2 mg Protein/g Trockengewebe im "Kontrollbein und nahm damit um 68 % zu (Abb. 28, Tab. 23)

Im Muskelgewebe stieg der Proteingehalt um 502 % von 1.9 mg Protein/g Trockengewebe in der ungeschädigten Extremität auf 11.04 mg Protein/g Trockengewebe in dem geschädigten Hinterlauf (Abb.28, Tab. 23) Damit verhält sich der Proteinübertritt in Muskel und Haut des "Ödembeines" statistisch signifikant unterschiedlich zu dem des Kontrollbeines ($p_{\text{Haut}} = 0.02$; $p_{\text{Muskel}} = 0.00$)

Die Haut des Ödembeines enthielt 2.66 ml Wasser/ g Trockengewebe , während der entsprechende Wert für das Kontrollbein bei 1.99 ml Wasser/ g Trockengewicht lag. Somit liegt der Flüssigkeitsgehalt der Haut im künstlich geschädigten Hinterlauf um 35% höher als im gesunden Bein. Der Unterschied ist mit $p = 0.0000$ hochsignifikant (Abb. 28, Tab. 23)

Im Muskel stieg der Flüssigkeitsgehalt von 3.05 ml H_2O / g Trockengewebe im Kontrollbein um 25% auf 3.65 ml H_2O /g Trockengewebe im Ödembein an. Diese Zunahme ist mit $p=0.004$ signifikant (Abb. 28, Tab.23)

Etacrynsäure löste also sowohl in Muskel und Haut ein eiweißreiches Ödem aus.

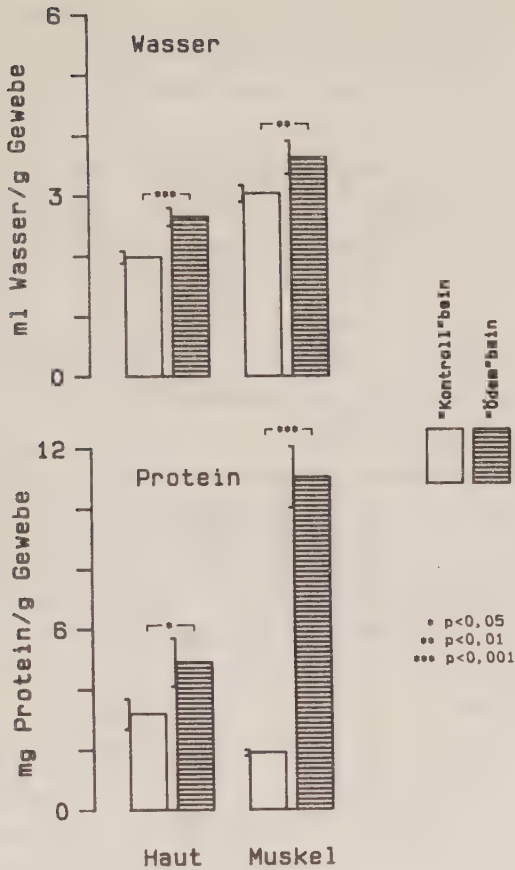


Abb.28 Protein- und Flüssigkeitsübertritt in das "Kontroll"- und "Ödem" bein der Kontrollkatzen (n = 6)

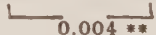
Das "Ödem"bein wurde 10 min mit 0.1 %iger Etacrynsäure perfundiert.

Haut- und Muskelproben werden jeweils getrennt betrachtet.

Tab.23 Protein- und Flüssigkeitsübertritt in das "Kontroll"- und "Ödem"-
bein der Kontrollkatzen

Werte des "Kontroll"- und "Ödembaines" (n=6)

<u>mg Plasmaprotein/g Trockengewicht</u>								
	<u>Haut</u>			<u>Muskel</u>				
	<u>"Kontroll"b.</u>	<u>"Ödem"b.</u>	<u>Steig.</u>	<u>"Kontroll"b.</u>	<u>"Ödem"b.</u>	<u>Steig.</u>		
			<u>um</u>			<u>um</u>		
x:	3.2	4.9		1.9	11.04			
SE:	0.5	0.8		0.1	1.02			
p:				68 %				502 %
		0.02 *			0.00 ***			

<u>ml Flüssigkeit/g Trockengewicht</u>								
	<u>Haut</u>			<u>Muskel</u>				
	<u>"Kontroll"b.</u>	<u>"Ödem"b.</u>	<u>Steig.</u>	<u>"Kontroll"b.</u>	<u>"Ödem"b.</u>	<u>Steig.</u>		
			<u>um</u>			<u>um</u>		
x:	1.99	2.66		3.05	3.65			
SE:	0.1	0.15		0.14	0.28			
p:				25 %				35 %
		0.00 ***			0.004 **			

SE: Standarderror

p: Signifikanz "Ödembein" im Vergleich zu "Kontrollbein"

4.2.1.2. Verumversuche

Die Katzen wurden 5 Tage lang mit Aescin-Dragees der Fa. Madaus, die den Wirkstoff in einer speziellen amorphen Form enthalten (s. Einleitung) vor-

gefüttert, und zwar in den Dosierungen 0.5/ 2/ 5 mg / Tier und Tag. Am 6. Tag wurde der Ödemversuch durchgeführt.

Der Gehalt an Ödemprotein-und Ödemwasser errechnete sich wiederum aus der Differenz zwischen Protein-und Wassergehalt des "Ödem"-und des "Kontroll"-beines. Der Vergleich dieser Werte mit denen der Kontrollen ließ erkennen, ob Aescin ödemprotektiv wirkt.

Einen Überblick über die verschiedenen Daten, die wir in den Verumexperimenten erhielten, gibt Tab. 24 und Abb. 29.

Seinen größten Einfluß auf das Ödemprotein übte Aescin in einer Dosierung von 5 mg aus. Es minderte das "Proteinödem" in der Haut von 1.68 mg Protein/g Trockengewicht um 65% auf 0.47 mg Protein/g Trockengewicht im Muskel von 9.12 mg Protein/g Trockengewicht um 60% auf 3.67 mg Protein/g Trockengewicht. Damit unterschied sich das Proteinödem im Muskel der Kontrolltiere mit $p = 0.003$ signifikant von demjenigen der mit Aescin behandelten Katzen.

Sowohl 0.5 als auch 2 mg Aescin steigerten in der Haut das Ödemprotein um 14%; im Muskel wurde es durch 0.5 mg Aescin um 30 %, durch 2 mg Aescin um 6% gesenkt.

Das "Ödemwasser" wurde von keiner der applizierten Aescindosen signifikant gesenkt.

Selbst 5 mg Aescin minderten das "Wasserödem" in der Haut nur um 29% von 0.66 ml H_2O /g Trockengewicht auf 0.47 ml H_2O /g Trockengewicht und im Muskel von 0.76 um 0.5 % auf 0.75.

Durch 0.5 mg Aescin nahm das " Flüssigkeitsödem" in der Haut von 0.66 ml H_2O /g Trockengewicht (Kontrolltiere) auf 0.3735 ml H_2O /g Trockengewicht ab; im Muskel wurde es sogar von 0.7699 ml H_2O /g Trockengewicht (Kontrollen) auf 0.4727 ml H_2O /g Trockengewicht gesenkt. Dies entspricht in der Haut einer Verminderung des Ödemwassers um 44%, im Muskel einer Abnahme um 39%.

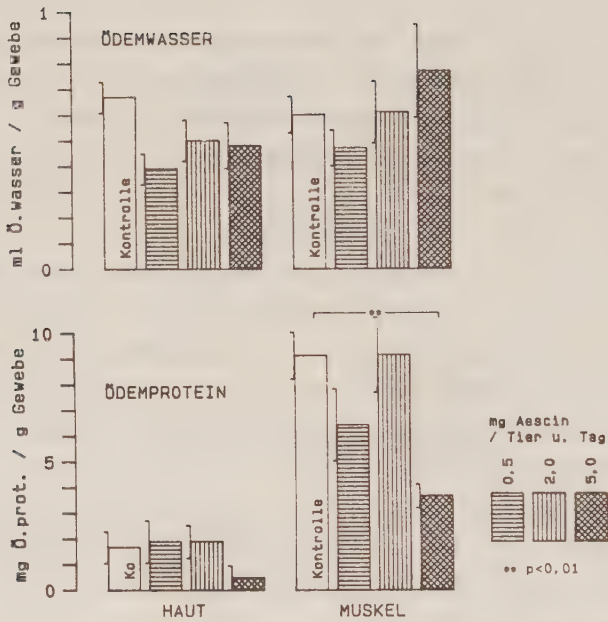


Abb.29 Hemmung des Etacrynsäureödems an der Katzenextremität durch Aescin

Verglichen werden die Kontrollen (n=6) mit den Experimenten mit 0.5 mg Aescin (n=3), mit 2 mg Aescin (n=3) und 5 mg Aescin (n=6).

Eine Aescindosis von 2 mg senkte in der Haut das Flüssigkeitsödem um 25 %
im Muskel um 21 %

Tab.24 Hemmung des Etacrynsäureödems an der Katzenextremität
durch Aescin

	<u>Kontrolle</u>	<u>Aescin</u>		
Dosierung				
(mg/Tier und Tag		0.5	2	5
5 Tage)				
	(n=6)	(n=3)	(n=3)	(n=6)
<u>Haut</u>				
mg <u>Ödempr./</u>	1.68	1.91	1.9	0.47
g Trockengew.	(0.62)	(0.82)	(0.64)	
Prozentuale				
Ödemhemmung		— 14%	—14%	65%
<u>Muskel</u>				
mg <u>Ödempr./</u>	9.12	6.42	8.63	3.67
g Trockengew.	(0.91)	(1.39)	(1.46)	(0.46)
Prozentuale				
Ödemhemmung		30%	6%	60%

<u>Haut</u>				
ml Ödemfl./	0.66	0.37	0.5	0.47
g Trockengew.	(0.06)	(0.06)	(0.07)	(0.08)
Prozentuale				
Ödemhemmung		44%	25%	29%

<u>Muskel</u>				
ml Ödemfl./	0.76	0.47	0.61	0.76
g Trockengew.	(0.06)	(0.06)	(0.11)	(0.18)
Prozentuale				
Ödemhemmung		39%	21%	0.5%

– SE (Standarderror) in Klammern

– negative Werte unter "prozentuale Ödemhemmung" bedeuten, daß der Ödemgehalt mit Pharmakon höher liegt als ohne Pharmakon (=Kontrolle)

4.2.2. Dynamik der Ödementstehung

Der oben beschriebene Zustand des Ödems bezieht sich auf den Zeitpunkt 45 Minuten nach Etacrynsäureapplikation. Jetzt soll der Verlauf der Ödementwicklung betrachtet werden.

Da in der Phase II, der Schädigungsphase, in der mit Etacrynsäure perfundiert wurde bzw. diese wieder ausgespült wurde, kein Blut im Hinterlauf der Katze floß, konnte währenddessen nur Flüssigkeit übertreten. Während der anschließenden 45-minütigen Beinperfusion gelangte auch Eiweiß in die Extremität. Zeitlich verfolgen konnten wir jedoch nur den Übertritt von niedermolekularer Flüssigkeit.

Da, wie in Material und Methoden beschrieben, durch eine Verschiebung der arterio-venösen Strömungsdifferenz sich das Volumen im Überlaufgefäß ändert, konnten wir anhand des Flüssigkeitsspiegels des Überlaufgefäßes feststellen, wieviel Wasser während der 45-minütigen Perfusion ins Interstitium filtriert ist.

Innerhalb dieser Zeitspanne lassen sich auch Aussagen über die Filtrationsgeschwindigkeit treffen.

So wird die Ödempathogenese durch folgende Parameter des Flüssigkeitsübertritts charakterisiert.

Akutes Ödem während Schädigungsphase:	Gesamte Menge an Flüssigkeit (in ml), die während der Perfusion des "Ödembaines" mit Etacrynsäure und dem folgenden Ausspülen mit physiol. NaCl in das Interstitium gelangt.
Filtration während Blutperfusion :	Das Flüssigkeitsvolumen, das im Anschluß an die Schädigungsphase während der 45-minütigen Blutperfusion filtrierte wird.
Filtrationsrate _{10 min} :	Filtrationsgeschwindigkeit in ml/min zum Zeitpunkt 10 min nach Schädigungsphase
Filtrationsrate _{35 min} :	Filtrationsgeschwindigkeit in ml/min , gemessen 35 min nach "Beinspülung"
Gesamtfiltration:	"Akutes Ödem" + "Filtration während Blutperfusion "

4.2.2.1. Kontrollversuche

Mehr als die Hälfte (14.4 ml Wasser) der gesamten filtrierte Flüssigkeit (23.3 ml) (s.Tab.25, Abb.30) die hier definitionsgemäß (s.o.) den Wasser- austritt in das g a n z e Bein umfaßt trat bereits während der Schädigungsphase in das Interstitium über. Somit verließ im Verlauf der 20-minütigen Etacrynsäure- und NaCl-Perfusion pro Zeiteinheit etwa doppelt so viel Flüssigkeit das Gefäßsystem wie während der folgenden 45-minütigen Perfusion mit Blut.

Jedoch nimmt die Filtrationsrate während des gesamten Versuches nicht kontinuierlich ab. Innerhalb der 45-minütigen Blutperfusion folgte einer Phase mit geringer Filtrationsgeschwindigkeit eine zweite mit höherer (s. Abb. 31, Tab.25).

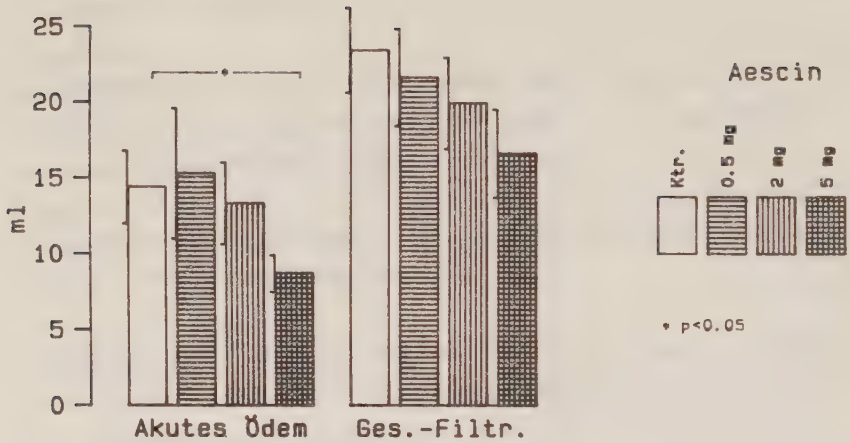


Abb.30 Dynamik der Ödementstehung an der Katzenextremität

Erklärung der Begriffe "Akutes Ödem" und "Gesamtfiltration"
im Text.

Verglichen werden die Kontrollen (n=6) mit den Versuchen mit
0.5 mg Aescin (n=3), mit 2 mg Aescin (n=3) und 5 mg Aescin (n=6).

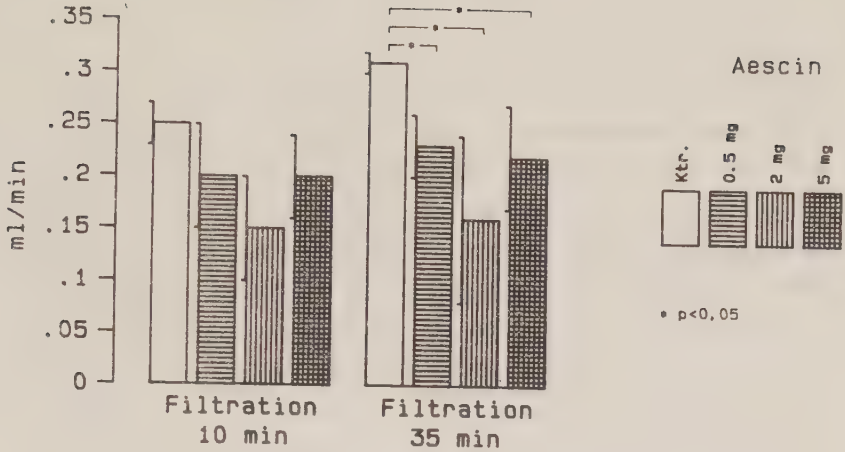


Abb.31 Dynamik der Ödementstehung an der Katzenextremität

Erklärung der Begriffe "Filtrationsrate_{10 min}" und "Filtrationsrate_{35 min}" im Text.

Verglichen werden die Kontrollen (n=6) mit den Experimenten mit 0.5 mg Aescin (n=3), mit 2 mg Aescin (n=3) und 5 mg Aescin (n=6).

So betrug diese 10 Minuten nach der Ödemerzeugung 0.25 ml/min, 35 Minuten nachher 0.31 ml/min. Der Unterschied in den Filtrationsraten ist aber nicht signifikant. ($p = 0.07$)

4.2.2.2. Verumversuche

Bei Verabreichung jeder Aescindosis (0.5, 2, 5 mg) gelangte insgesamt jeweils weniger Flüssigkeit in das Bein als bei den Kontrollexperimenten, doch erwies sich dieser Unterschied in keinem Fall als signifikant (s. Tab.-25) Signifikant ($p = 0.04$) reduziert wurde das *a k u t e* Ödem, das auch bei allen Verumexperimenten mehr als die Hälfte der Gesamtfiltration ausmacht, durch 5 mg Aescin. Es traten 8.7 ml Flüssigkeit im Vergleich zu 14.4 ml bei den Kontrollen ins Gewebe über, also um 37.5 % weniger.

Reduziert wurde durch jede Aescindosis auch die Filtrationsrate 10 bzw. 35 min nach Beginn der Blutperfusion. Erstere wurde zwar nie signifikant, jedoch durch 0.5 mg Aescin um 20%, durch 2 mg Aescin um 40 % und durch 5 mg Aescin um 20 % erniedrigt. Die Filtrationsgeschwindigkeit 35 min nach Beginn der Blutperfusion verhielt sich für alle Dosen von Aescin signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen. (0.5 mg Aescin: $p = 0.01$; 2 mg Aescin: $p = 0.02$; 5 mg Aescin: $p = 0.04$)

Tab.25 **Dynamik der Ödementstehung an der Katzenextremität**

Kontrollversuche (n=6)

Aescinversuche, oral mit 0.5 mg (n=3), 2 mg (n=3), 5 mg (n=6)

Aescin/Tier und Tag—5 Tage

	Kontrolle	Aescin			mg
		0.5	2	5	
akutes Ödem (ml)	14.4 (2.4)	15.3 (4.3)	13.3 (2.7)	8.7 (1.2)	
p zu Kontrolle		n.s.	n.s.	0.04	
Prozentuale Hemmung		-6.2 %	7.7 %	37.5 %	
Filtration ₁₀ (ml/min)	0.25 (0.02)	0.2 (0.05)	0.15 (0.05)	0.2 (0.04)	
p zu Kontrolle		n.s.	n.s.	n.s.	
Prozentuale Hemmung		20 %	40 %	20 %	
Filtration ₃₅ (ml/min)	0.31 (0.01)	0.23 (0.03)	0.16 (0.08)	0.22 (0.05)	
p zu Kontrolle		0.01 *	0.02 *	0.04 *	
Prozentuale Hemmung		26 %	48 %	29 %	
Gesamtfiltration (ml)	23.4 (2.8)	21.65 (3.2)	19.9 (3.01)	16.58 (2.96)	
p zu Kontrolle		n.s.	n.s.	n.s.	
Prozentuale Hemmung		7.1 %	14.6 %	28.9 %	

—SE (Standarderror) in Klammern

—der negative Wert unter "prozentuale Hemmung" bedeutet, daß das "akute Ödem" mit Pharmakon höher liegt als ohne Pharmakon (= Kontrolle)

4.2.3. Arterieller Perfusionsdruck

Der arterielle Perfusionsdruck wurde am Anfang des Versuches, nach Evansbluegabe und am Ende der 45-minütigen Blutperfusion, also nach der Ödementstehung bestimmt.

4.2.3.1. Kontrollversuche

Bei den Kontrollen stieg der Perfusionsdruck von 90 mm Hg signifikant auf 132 mm Hg ($p=0.004$) nach der Evansbluegabe und dann bis zum Ende der 45-minütigen Perfusion auf 147 mm Hg ($p=0.004$) (s.Tab. 26, Abb. 32). Damit lag der arterielle Perfusionsdruck am Ende um 72 % oberhalb des Ausgangswertes (s.Tab. 26, Abb.31)

4.2.3.2. Verumversuche

Für alle Dosierungen von Aescin nahm —wenn auch nicht immer signifikant— wie bei den Kontrollen, der Perfusionsdruck im Verlaufe der Evansbluegabe zu, und zwar durch 0.5 mg Aescin von 71 auf 93 mm Hg ($p=0.02$) durch 2 mg von 70 auf 156 mm Hg, durch 5 mg von 99 auf 135 mm Hg ($p=0.004$) Der Anstieg des Perfusionsdruckes während der 45-minütigen Blutperfusion nach der Schädigungsphase, der bei den Kontrollversuchen zu sehen war, wurde auch bei den Experimenten beobachtet, bei denen Aescin in einer Dosis von 2 mg verabreicht worden war. Hingegen stieg der Perfusionsdruck durch eine Applikation von 0.5 bzw. 5 mg Aescin/Tier/Tag—5 Tage weniger stark. Am Ende des Versuches unterschied sich der Perfusionsdruck der mit 5 mg Aescin behandelten Katzen signifikant von dem der Kontrollkatzen.

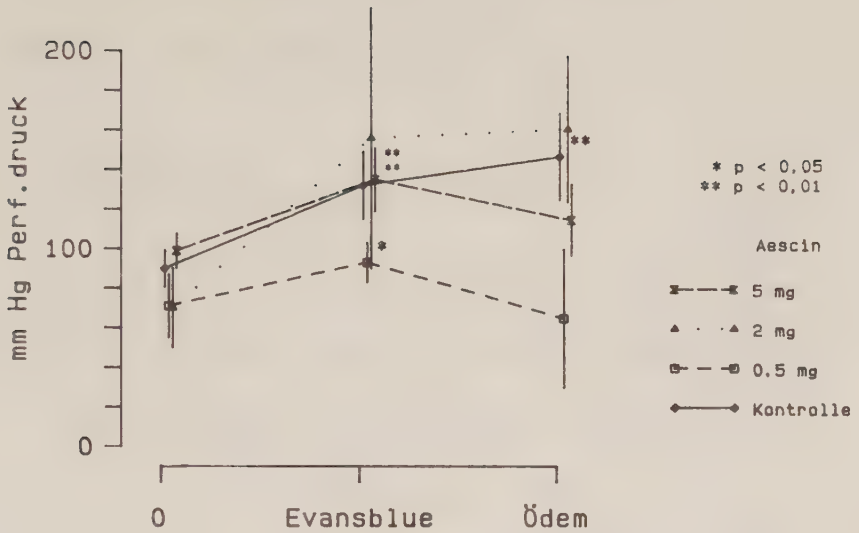


Abb.32 Einfluß von Aescin auf den arteriellen Perfusionsdruck

Der arterielle Perfusionsdruck wurde zu Beginn des Versuches (Zeitpunkt "0"), am Ende der Evansbluegabe ("Evansblue") und nach der Blutperfusion und damit nach der Ödembildung ("Oedem") gemessen.

Verglichen wurden die Kontrollen (n=6) bzw. die Verumexperimente mit 0.5 mg Aescin (n=3), 2 mg Aescin (n=3) und 5 mg Aescin (n=6) jeweils zum Zeitpunkt "Evansblue" und "Ödem" mit dem Zeitpunkt "0". Darauf bezieht sich auch p.

Abb.25 Einfluß von Aescin auf den arteriellen Perfusionsdruck
 Perfusionsdruckwerte zu Beginn des Versuches (Zeitpunkt "0", am Ende der Evansblueapplikation ("Evansblue") und am Ende des Versuches, also nach Ödemerzeugung ("Ödem") in mm Hg. Zunahme am Ende gegenüber dem Anfang des Versuches in %.

	"0"	"Eb."	"Ö"	Zun. (%)
<u>Kontrolle (n=6)</u>	90 (9.3)	132 (17)	147 (22)	172.9 %
p im Vergleich zu "0"		0.004	0.004	
<u>Aescin -0.5 mg (n=3)</u>	71 (16)	93 (10)	65 (35)	91.5 %
p im Vergleich zu "0"		0.02	n.s.	
<u>Aescin - 2 mg(n=3)</u>	70 (20)	156 (66)	161 (37)	230 %
p im Vergleich zu "0"		n.s.	n.s.	
<u>Aescin - 5 mg (n=6)</u>	99 (8.7)	135 (16)	115(18)	116 %
p im Vergleich zu "0"		0.004	n.s.	

SE (Standarderror) in Klammern

Die einzelnen Aescin-Dosierungen gelten jeweils pro Tier und Tag— 5 Tage lang.

Zun.(%): Zunahme des Perfusionsdruckes am Ende des Versuches ("Ö") im Vergleich zum Anfang ("0")

4.2.4. Systemischer Blutdruck

Es wurde der mittlere Blutdruck ($RR = \frac{2 \text{ diast.} + \text{ syst.}}{3}$) zu den gleichen Zeitpunkten wie der arterielle Perfusionsdruck gemessen.

4.2.4.1. Kontrollversuche

Der Blutdruck der Kontrollkatzen betrug zu Beginn des Versuches im Mittel 68 mm Hg und sank im Verlaufe des Experiments bis auf 60.5 mm Hg (s.Tab.27, Abb. 33). Evansblue beeinflusste den Blutdruck nicht.

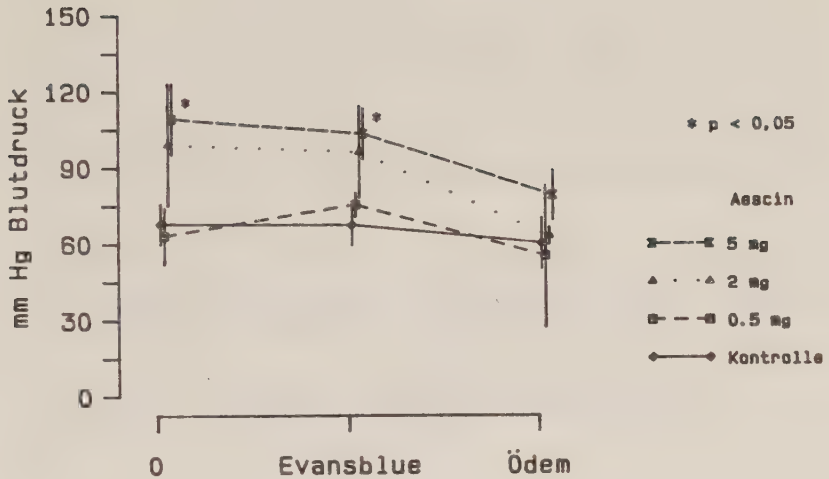


Abb.33 Steigerung des systemischen Blutdrucks durch Aescin

Der systemische Blutdruck wurde zu Beginn des Experiments (Zeitpunkt "0"), am Ende der Evansbluegabe ("Evansblue") und nach der Blutperfusion und damit nach der Ödemerzeugung ("Oedem") gemessen.

Verglichen wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten die Verumexperimente mit 0.5 mg Aescin (n=3), mit 2 mg Aescin (n=3) und 5 mg Aescin (n=6) mit den Kontrollen (n=6). Darauf bezieht sich auch p.

4.2.4.2. Verumversuche

Bei allen Dosierungen von Aescin (0.5/2/5 mg /Tier/Tag— 5 Tage) sank — genau wie bei den Kontrollen — der Blutdruck im Laufe des Versuches (s. Tab. 27, Abb. 33)

Die Wirkung des Aescins (2 oder 5 mg) wird hier — im Gegensatz zum Perfusionsdruck— durch einen Anstieg des Blutdrucks zu Beginn des Versuches deutlich. Diese Steigerung war für die Dosierung von 5 mg Aescin/Tier und Tag — 5 Tage statistisch signifikant (s. Tab.27, Abb. 33)

Tab.27 Steigerung des systemischen Blutdrucks durch Aescin

Blutdruckwerte zu Beginn des Versuches (Zeitpunkt "O"), am Ende der Evansblueapplikation ("Evansblue") und am Ende des Versuches nach der Ödemerzeugung ("Oedem") in mm Hg.

	" O "	Pr. St.	" Eb."	" Oe."
Kontrolle (n=6)	68.0 (7.9)		67.5 (7.8)	60.5 (10.08)
Aescin —0.5 mg (n=3)	63.3 (11.8)	—7 %	75.6 (4.7)	55.6 (28.1)
—2 mg (n=3)	99.3 (24.5)	46 %	96.3 (1.3)	63.3 (3.3)
—5 mg (n=6)	109.6 (14.1)	61.2 %	103.6 (10.8)	79.5 (9.8)

Die einzelnen Aescin—Dosierungen gelten jeweils pro Tier und Tag — 5 Tage lang.

—SE (Standarderror) in Klammern

—"Pr. St." : Prozentuale Steigerung der Verumexperimente gegenüber Kontrollen, jeweils zum Zeitpunkt "O".

—der negative Wert unter "prozentuale Steigerung" bedeutet, daß der Blutdruck mit Pharmakon niedriger lag als ohne Pharmakon.

5. DISKUSSION

5.1. Etacrynsäureödem an der isolierten Ohrrendvene des Schweines als in-vitro Modell zur Untersuchung ödemprotektiver Substanzen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein in-vitro Modell für das morphologische Gefäßwandödem aufzubauen, an der man ödemprotektive Substanzen auf ihre Wirksamkeit testen kann.

Wir bedienten uns hierzu der isolierten Ohrrendvene (Vena auricularis lateralis) des Schweines.

Vorteile des in-vitro Modells an der Ohrrendvene sind:

1. Die Schweineohren fallen am Schlachthof sowieso als Schlachtnebenprodukt an, welches ansonsten wertlos ist.
2. Es können Tierversuche vermieden werden, die ethisch problematisch sind und in starker öffentlicher Diskussion stehen.
3. Die Schweineohren sind im Gegensatz zu Versuchstieren kostenfrei.
4. Bei den Ohren handelt es sich um ein einfach zugängliches Organ.
5. Die Präparation der Vena auricularis ist leicht, da diese im Ohr sehr oberflächlich liegt, ausreichend groß und durch die helle Haut des Schweines gut sichtbar ist.

Die Ohrrendvene schien für unsere Ödemversuche geeignet, da sie in vorhergehenden Experimenten ihre Vitalität auch nach der Abtrennung vom frisch geschlachteten Tier bewies. So kontrahierte und dilatierte sie

sich nach Gabe von Katecholaminen und Acetylcholin. (Schneider, 1985, Ochsenkühn, 1988; Layer, 1988, Müller, 1988).

In der Tat war es möglich, an unserer Versuchsanordnung zum Gefäßwandödem (s. Methodik) eine vermehrte Permeabilität der Ohrrendvene auszulösen.

Durch 5 bzw. 7.5 minütiges Einwirken von Etacrynsäure (0.05 %) bzw. 2.5, 5 oder 7.5 minütige Applikation von Etacrynsäure (0.1 %) wurde die Durchlässigkeit der Venenwand für Proteine signifikant erhöht. In einer Konzentration von 0.1 % (2.5 min) testeten wir die Wirksamkeit von Etacrynsäure auf die Durchlässigkeit von niedermolekularen Evansblue und erzielten ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Permeabilität.

Ob und wenn ja, in welcher Konzentration und bei welcher Applikationszeit ödemprotektive Substanzen vor dieser erhöhten Durchlässigkeit der Venenwand schützen wurde getestet. Als Beispiele dienten TMHC, Ruscus-Extrakt, HR und Aescin.

Die 3 erstgenannten Pharmaka reduzierten die künstlichgesteigerte Durchlässigkeit für Protein, wenn sie vorab für 15 Minuten in einer Konzentration von 0.005% (TMHC und Ruscus) bzw. 0.05% (HR) und dann in derselben Konzentration 2.5 Minuten lang gleichzeitig mit Etacrynsäure (0.1%) verabreicht werden. Aescin zeigte keinen Schutzeffekt.

Daß der ödemprotektive Effekt von TMHC, Ruscus-Extrakt und HR dadurch zustandekam, daß eine oder mehrere Komponenten der Pharmaka die Etacrynsäure komplexierten und so außer Gefecht setzten, konnte durch DC ausgeschlossen werden.

Damit ist es also gelungen, an einem in in-vitro Modell ödemprotektive Pharmaka unabhängig von Versuchen am lebenden Tier zu testen.

Weitere Vorteile unserer Versuchsanordnung sind:

1. Es findet — unabhängig vom Gesamtorganismus keine Metabolisierung der Pharmaka statt und es müssen Resorption, Speicherung, Verteilung

und Elimination der Substanzen nicht in Betracht gezogen werden.

2. Da man die Pharmaka in Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung applizieren kann, fällt außerdem die Möglichkeit einer Bindung der Pharmaka an Plasmaproteine weg.

Damit erhält man in-vitro Aufschluß darüber, ob ein Pharmakon in seiner nativen Form ödemprotektiv wirkt und welche Konzentration am Wirkort nötig ist.

3. Es ist möglich, die Ödemprotektiva sowohl intra-als auch extravasal zu applizieren. Somit kann man klären, ob diese in das Gewebe eindringen.

Zur Übertragbarkeit einer ödemprotektiven Wirkung von "Venenn Mitteln" von diesem in-vitro-Modell auf ihren effektiven Einsatz an Kranken mit CVI läßt sich folgendes sagen:

1. Das Schwein ist wie der Mensch ein Allesfresser. Gleiche Ernährungsbedingungen beeinflussen den Stoffwechsel und die Ausprägung der Venen und damit das Gefäßwandödem in ähnlicher Weise. Weinstein (1965) berichtet, daß die Epidermis des Schweines, welche als epitheliales Gewebe dem Endothel der Venen verwandt ist, der menschlichen sowohl histologisch, als auch in bezug auf die Kinetik der epidermalen Proliferation ähnelt. Schweineohrvenen werden also gleichermaßen auf Noxen und Pharmaka reagieren wie die menschliche Beinvene.

2. Wir wählten als schädigendes Agens Etacrynsäure. Sie ruft am Kapillarendothel eine "Abflachung" und blasenartige "Protuberanzen" hervor. (Hammersen, 1983).

Seydewitz und Staubesand (1984) untersuchten menschliche variköse

Venen und als Kontrolle dazu Saphenavenen, die bei aorto-coronaren Bypass-Operationen anfielen. Dabei erkannten sie bei den erkrankten Venen eine Störung der geordneten Kollagenfibrillen, die oft mit "Kaliberschwankungen" von 400–1200 Å im Normbereich bis zu 200 Å einhergehen, und gleichzeitig beobachteten sie eine Zunahme des Wassergehaltes der Proteoglykanstruktur.

Das Kapillarendothel wird also durch Etacrynsäure in ähnlicher Weise wie die Venenwand von Patienten mit CVI einerseits geschwächt, andererseits ödematös aufgeschwemmt.

3. Darüberhinaus wird auch diskutiert, daß die Schutzwirkung von ödemprotektiven Substanzen sogar unspezifisch sowohl hinsichtlich des auslösenden Agens, als auch der zu schützenden Struktur ist (Felix, 1983, 1986)

5.2. Zum Wirkungsmechanismus der Etacrynsäure

Zur weiteren Untersuchung der ödemprotektiven Substanzen, sind zunächst folgende Fragen von Bedeutung:

Wie wirkt die Etacrynsäure? Wie beeinflußt sie den Transport von niedermolekularer Flüssigkeit und Protein in die ungeschädigte Venenwand? Während niedermolekulare Flüssigkeit wie Evansblue wohl durch Filtration in die ungeschädigten Gefäße gelangt, werden für Proteine 2 Transportmechanismen diskutiert, Pinozytose und Filtration.

Bei unseren Experimenten bei 0°C – einer Temperatur, wo potentielle Pinozytoseprozesse blockiert sind – trat in die ungeschädigten Venen gleichviel, in die geschädigten Gefäße weniger Protein als bei 39°C über. In beiden Fällen gelangte mit steigendem Druck – Filtrationsprozesse sind druckabhängig – mehr Protein in die Venen.

Da es äußerst unwahrscheinlich ist, daß eine organische Säure pinozytoseartige Prozesse auslöst und auch die Etacrynsäure bei 0°C nicht an Stärke verloren hat (sie ist bei 0°C nicht ausgefallen; der pK_s -Wert bei dieser Temperatur unterscheidet sich nicht wesentlich von dem bei 39°C), kann man sich vorstellen, daß Proteine mittels Filtration die ungeschädigte Venenwand erreichen und Etacrynsäure diese Prozesse verstärkt. Die Etacrynsäure greift wohl temperatursensitive Membranstrukturen im Endothel an, die bei 0°C in einer Art Erstarrung vorliegen, bei Körpertemperatur jedoch die Permeabilität der Intima bestimmen.

Ring et al (1983) führten Experimente an Liposomen durch, die ja eine Art unit-membrane darstellen und erkannten, daß sich deren Permeabilität je nach herrschender Temperatur verändert. Hammersen (Hammersen, 1983) beschreibt die Wirkung von Etacrynsäure an Kapillaren mit einem vermehrten Auftreten von Zytoplasmavortreibungen und der Ausbildung von tiefen Invaginationen der luminalen Zellmembran.

Inwiefern der von verschiedenen Autoren (Manuel und Weiner, 1976; Harper et al, 1975; Yanase et al, 1983) beobachtete Eingriff der Etacrynsäure in den Energiestoffwechsel auch an Endothelzellen zur Geltung kommt, bleibt zu klären. Yanase et al (1983) berichtet, daß die Etacrynsäure das System des Elektronentransports in Mitochondrien hemme und als Entkoppler in der Atmungskette fungiere. Entkopplung bedeutet (Harper et al, 1975), daß Oxidationsvorgänge innerhalb der Atmungskette von den Phosphorylierungsvorgängen abgetrennt werden. Die Folge ist eine sogenannte unkontrollierte Atmung, bei der letztlich die Energie der Redoxreaktionen nicht mehr auf energiereiche Phosphatverbindungen übertragen, sondern in Wärme umgesetzt wird.

Unsere Experimente deuten jedenfalls daraufhin, daß durch Etacrynsäure Membranstrukturen im Endothel in ihrer Tiefe reduziert werden und aufgrund geringerer Diffusionsstrecken dann eine vermehrte Durchlässigkeit mittels Filtration ausgelöst wird.

Es ist leicht einzusehen, daß diese Filtration in höherem Maße für niedermolekulare Stoffe wie Evansblue als für hochmolekulare Eiweißkörper stattfindet. (Etacrynsäure steigert die Permeabilität des Evansblue um 129 %, die des Proteins um 68 %)

S.3. Zum Wirkungsmechanismus von TMHC, Ruscus-Extrakt, HR und Aescin an der isolierten Ohrdravene des Schweines

Auf welche Weise beeinflussen TMHC, Ruscus-Extrakt und HR diese Filtration? Überziehen sie das Endothel gleichsam wie mit einem Film oder liegt ihrer Schutzwirkung ein anderer Mechanismus zugrunde?

Ein Abdichten des Endothels kann höchstens für TMHC diskutiert werden, da nur TMHC auch die Permeabilität der ungeschädigten Venen reduziert (siehe unten).

Für Ruscus-Extrakt und HR liegt — da die Etacrynsäure in den Kontroll-experimenten wohl Membranstrukturen in der Gefäßwand angegriffen hat (s.o.) — der Schluß nahe, daß es diese stabilisiert und so vor einem Angriff der Etacrynsäure schützt. Ob dieser Mechanismus auch für TMHC eine Rolle spielt, bleibt dahingestellt.

Die Wirksamkeit von HR schrieb auch Hammersen (1978, 1983, s.Einleitung) einem allgemeinen Membraneffekt zu, und zwar sowohl beim morphologischen, als auch beim entzündlichen Ödem. Für Fritz-Niggli (1978, s.Einleitung) beruht die Schutzwirkung von HR bei der Strahlentherapie gegenüber gesundem Gewebe in der Stabilisierung von Permeabilitätsstörungen der Membranen.

Neben dem Mechanismus zur ödemprotektiven Wirkung kristallisieren sich aus unseren Versuchen noch weitere Eigenschaften der getesteten Pharmaka heraus.

TMHC reduziert den Protein- bzw. Flüssigkeitsübertritt in die ungeschädigten Gefäße

So reduzierte TMHC (0.005%) die Permeabilität der ungeschädigten Venen für Protein und niedermolekulare Flüssigkeit.

Es verklebt wohl die Interendothelialspalten des Endothels bzw. die Poren der Zellmembranen.

Ruscus-Extrakt und Aescin interagieren so stark mit dem Endothel, daß sie beim Ausspülen gleichsam Lücken hinterlassen

Appliziert man Ruscus-Extrakt bzw. Aescin vorab und spült diese wieder aus, so erhöht sich die Proteinpermeabilität sowohl der ungeschädigten, als auch der geschädigten.

Die einzige Erklärung hierfür liegt darin, daß Ruscus-Extrakt bzw. Aescin – beide gehören zu den oberflächenaktiven Substanzen – so feste Wechselwirkungen mit dem Endothel eingehen, daß sie beim Ausspülen gleichsam Lücken hervorrufen. Für eine Art Bindung spricht auch ihre lange Gewebehalbwertszeit (diese beträgt für Ruscus-Extrakt 24 Stunden, für Aescin vermutlich einige Tage). (Felix, 1986)

HR benötigt zu seiner Wirkungsentfaltung einen stetigen Zustrom von Ca^{++} -Ionen.

Experimente, bei denen bei abgeschalteter Perfusion 60 min HR in physiologischer Krebslösung, HR in Krebslösung mit 3-facher Ca^{++} -Konzentration, HR in Ca^{++} -freier Krebslösung bzw. physiologische Krebslösung, Krebslösung mit 3-facher Ca^{++} -Konzentration und Ca^{++} -freie Krebslösung auf die ungeschädigten Venen einwirkte, ergab, daß HR Ca^{++} -Ionen komplexiert. Auch Wagner (1984) schreibt Flavonoiden chelatbildende Eigenschaften zu.

Auf welche Weise ruft ein Ca^{++} -Mangel eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand hervor?

Eine wesentliche Barriere für den Stofftransport aus dem Lumen in die Gefäßwand stellt die Basallamina dar (s. Einleitung). Diese besteht vorallem aus einer Proteoglykanmatrix, welche stark hydratisiert ist. Entzieht man diesen Hydrathüllen ihre Gegenionen (Ca^{++} , Mg^{++} , Na^{+}), so brechen sie zusammen und man kann sich vorstellen, daß Lücken im Proteoglykangerüst entstehen und die Permeabilität erhöhen.

Die in-vitro beobachtete Chelatbildung von HR mit Ca^{++} (und wohl auch anderen Ionen), welche zu der unerwünschten Permeabilitätssteigerung führt, kann – wie die *P e r f u s i o n* von HR zeigte, in-vivo jedoch durch ständige Zufuhr von frischen Ca^{++} -Ionen kompensiert werden.

Die Wirkung von Aescin hängt von der Dosis ab

Für Aescin konnte in keiner der applizierten Konzentrationen (0.0025 %, 0.01%, 0.1%) an Ohrrendvenen eine Reduzierung der künstlich gesteigerten Proteinpermeabilität, jedoch in der Konzentration von 0.0025% eine Hemmung der vermehrten Flüssigkeitspermeabilität beobachtet werden. Da von verschiedenen Autoren (s.unten) behauptet wird, daß Aescin zu seiner Entfaltung als Ödemprotektivum den Gesamtorganismus benötigt und nur unter bestimmten Umständen auch in vitro entquellende Effekte zeigt (s. unten), möchte ich die genannten Befunde später im Zusammenhang mit der in-vivo Wirkung von Aescin behandeln.

Was den Effekt von Aescin auf die Proteinpermeabilität der u n g e s c h ä d i g t e n Venen anbelangt, so verminderte es diese in einer Konzentration von 0.0025 bzw. 0.01% nicht, in einer Konzentration von 0.1% erhöhte es sie jedoch beträchtlich. Das Triterpensaponin steigerte also dosisabhängig die Durchlässigkeit der ungeschädigten Venen.

Auch Abé et al (1981) beschreiben, daß die von ihnen untersuchten Saikosaponine die Erythrozyten in niedriger Dosierung vor Hämolyse schützten, in hoher Dosis jedoch selbst hämolytisch aktiv waren. Casley-Smith et

al. (1975) ziehen aus ihren Untersuchungen über Flavonoide den Schluß, daß sowohl ein zuviel wie ein zuwenig dieser Substanzen zu Endothelschädigungen führe. Daß Mono-(O-beta-hydroxy-aethyl)-7-rutoside einen antiödematösen Effekt haben, bei schneller i.v.-Injektion und bei höherer Dosierung jedoch ein Ödem verstärken, berichten Lecomte und van Cauwenberge (1974).

Dem Mechanismus, wie diese mehr "schädigende" Wirkung der ödemprotektiven Substanzen zustande kommt, gingen Byung Sul Yu und In-Ho Jo (1984) nach. Sie fügten verschiedene Saponine (Echinosid A, Bivittosid D und Holothurium A) einmal in niedriger Konzentration (0.05 mM) und einmal in höherer Konzentration (0.5 mM) einer Lösung von Liposomen zu. Dabei stellten sie fest, daß die genannten Substanzen in der geringeren Konzentration das osmotische Verhalten der Liposomen, welche sonst als perfekte Osmometer funktionierten, lediglich störten, in höherer Konzentration jedoch vollständig lysierten. Der Grad der Lyse hing von der chemischen Struktur der Saponine ab, die ihre Affinität zu Cholesterin, einem Bestandteil der Liposomen, bedingte.

Hält man die oben getroffene These aufrecht, daß ödemprotektive Pharmaka Wechselwirkungen mit Membranstrukturen eingehen und diese stabilisieren, so muß sie dahingehend eingeschränkt werden, daß dies nur geschieht, wenn die Substanzen in bestimmten Konzentrationen vorliegen. In hohen Konzentrationen lysieren sie die Membranen, indem sie vorallem an Cholesterin binden und dieses wohl dann "herausziehen". (Byung et al, 1984)

5.4. Zur Wirkung von Aescin an der Katzenextremität — Vergleiche mit seinem in-vitro Effekt

Ob Aescin in-vivo überhaupt ödemprotektiv wirkt, wurde am morphologischen interstitiellen Ödem der Katzenextremität getestet. Das nicht-entzündliche Ödem wurde ebenfalls durch Etacrynsäure ausgelöst.

Anders als an der isolierten Ohrrendvene steigert Etacrynsäure an der Katzenextremität vorwiegend die Proteindurchlässigkeit

Im Gegensatz zur isolierten Ohrrendvene, wo in den meisten Versuchen die Etacrynsäure (0.1 %) 2.5 min bei abgeschalteter Perfusion einwirkte, durchströmten wir die Katzenextremität 10 min mit 0.1 %iger Etacrynsäure. Hier verstärkte die Etacrynsäure — im Gegensatz zum Gefäßwandödem — (s. o.) vorallem die Proteinpermeabilität, nämlich die des Muskels um 502%, die der Haut um 68 %. Die Permeabilität für niedermolekulare Flüssigkeit wurde im Muskel nur um 25 %, in der Haut um 35 % gesteigert. Dies rührt wohl daher, daß auch die gesunden Kapillaren — anders als die Wand der großen Venen — für niedermolekulare Stoffe aufgrund der trans- und interzellulären Lücken in hohem Maße durchlässig sind.

Etacrynsäure löst ihre Wirkung sofort aus und läßt die Gefäßwände erstarren.

Im Unterschied zu den Schweineohrvenen konnte an der Katze die Entstehung des Flüssigkeitsödem, das hieranhand des vermehrten W a s s e rgehaltes des "Ödem" beines gemessen wurde, unmittelbar während der Schädigungsphase und während der nachfolgenden Blutperfusion verfolgt werden.

So gelangte weit mehr als die Hälfte des gesamten filtrierten Volumens bereits während der akuten Phase der Ödempathogenese ins Interstitium. Doch dauerte dieser Abschnitt etwa halb so lang wie die anschließende 45-minütige Blutperfusion.

Die Etacrynsäure wirkte also zum größten Teil sofort.

Darüberhinaus hält ihr schädigender Einfluß auf die Kapillaren an, nachdem sie wieder ausgespült worden ist.

Auch an isolierten Darmabschnitten übte die Etacrynsäure noch weiter eine Wirkung aus, nachdem sie längst aus dem Organbad entfernt war. (Felix, 1983)

Zudem konnte bei den in-vivo Versuchen die Auswirkung der Schädigung mit Etacrynsäure auf den arteriellen Perfusionsdruck, welcher ein Maß für den Arterioltonus ist, gemessen werden.

Der Perfusionsdruck stieg nach der Schädigungsphase auf 172 % an. Gründe dafür könnten vielfältig und vielleicht gar nicht so einfach zugänglich sein. Thulesius und Chairman (1983) nannten verschiedene Parameter, durch die das Strömungsverhalten im Kapillargebiet beeinflußt werden kann. Sie führen z.B. den Dehnungszustand der Gefäße, metabolische Anforderungen des umliegenden Gewebes und den Zustand der Endothelzellen an. So kann man sich vorstellen, daß durch die Schädigung der Arteriolen mit Etacrynsäure, jene ihre Elastizität verlieren und dem Blutfluß einen gesteigerten Widerstand entgegensetzen (Felix, mündliche Mitteilung). Hammersen (1983) fand in elektronenoptischen Untersuchungen des Kapillarendothels von Katzen, die zuvor mit Etacrynsäure perfundiert worden waren, eine erhöhte Zahl von Endothelblasen, aber auch Thrombozytenaggregate.

Unterschiedliche Wirkung von Aescin auf "Protein"- und "Wasser"ödem, sowohl in vivo als auch in-vitro

Einen signifikanten Effekt auf verschiedene Parameter (s.u.) übte Aescin an der Katzenextremität fast ausschließlich in einer Dosierung von 5 mg/Tier und Tag — 5 Tage aus. So wurde auch das "Proteinödem" im Muskel durch 5 mg Aescin signifikant gehemmt.

Darüberhinaus reduzierte Aescin in höherer Dosierung (5 mg) vor allem die erhöhte Proteindurchlässigkeit, in niedriger Dosierung (0.5 mg) hauptsächlich die gesteigerte Wasserpermeabilität.

Während Aescin in-vitro sonst keine Wirkung zeigte (s.u.), reduzierte es in der geringen Dosis von 0.0025 % die erhöhte Flüssigkeitspermeabilität. Daß die Hemmung des "Flüssigkeitsödems" an der Katzenextremität bei hoher Dosierung des Pharmakons durchaus schwächer war als die des "Proteinödems", kann daher rühren, daß bei der Schädigung die Mikroge-

fäße zuerst für niedrigmolekulare Flüssigkeit und dann erst für Proteine durchlässig werden (Felix, 1978). Den Effekt, den Aescin in niedriger Dosierung auf das "Flüssigkeitsödem" in vivo und in vitro ausübt, läßt sich nach Siering (1962) erklären.

Er stellte an Zellen des Ehrlich'schen Mäuse-Ascites-Carcinoms unter dem Einfluß von Aescin morphologische Veränderungen fest. Zuerst nahm die Zellgröße durch einen vermehrten K^+ -Austritt ab, dann durch Na^+ -Einstrom zu. Der Autor schloß daraus, daß bei den therapeutischen Aescindosen die Zellen in einem Stadium verharren, in der ihre Membran wohl für K^+ permeabel ist, jedoch noch nicht für Natrium. Siering sah als Folge davon eine Entquellung des Gewebes. So könnte auch bei unseren Versuchen, bei denen die Katzenextremität mit 0.5 mg Aescin behandelt worden ist, bzw. die Venen 0.0025 %iges Aescin erhielten, ein Flüssigkeitsentzug des Gewebes vonstatten gegangen sein, während die größeren Proteinmoleküle nicht ausgeschwemmt wurden.

Dynamik der Ödementstehung

Während Aescin in der Dosierung von 5 mg das gesamte "Wasserödem" nicht vermindert, senkt es den Wasserübertritt im Verlaufe der Schädigungsphase signifikant um etwa ein Drittel. Eine Erklärungsmöglichkeit liegt darin, daß eine Schutzwirkung des Aescin sich stärker bemerkbar macht, wenn das Ödem größer ist, wie es beim akuten (Wasser)-Ödem der Fall ist.

Auch könnte Aescin seinen ödemprotektiven Effekt vorallem im Anfangsstadium des Versuches entfalten. Es soll ja genau 16 Stunden (s.u.) nach seiner Verabreichung am besten wirken. Dagegen spricht jedoch, daß Aescin (5 mg) die Filtrationsrate 35 Minuten nach Ödemerzeugung signifikant um 29 % senkt.

Aescin verhindert Ansteigen des Perfusionsdruckes und steigert Blutdruck

Eine Schutzwirkung von Aescin zeigte sich auch im Perfusionsdruck, der sich im Verlaufe des Versuches nicht — wie bei den Kontrollen — signifikant erhöhte. In diesem Zusammenhang ist vor allem an die Folgen des protektiven Effekts auf den interstitiellen Druck, die Endotheloberfläche und die Fließeigenschaften des Blutes zu denken. Durch 5 mg Aescin/Tier und Tag — 5 Tage lang wird außerdem — im Gegensatz zu den Kontrollkatten — der Blutdruck signifikant gesteigert. Auch Annoni et al (1979) stellten fest, daß Aescin in einer Konzentration von 10^{-4} g/ml isolierte, spiralig aufgeschnittene Venae saphenae des Menschen kontrahierte. Die Tonicisierung hielt eine Stunde an. Ein kontrahierender Effekt des Aescin wurde auch von anderen Autoren gefunden. (Berti, 1977; Longiave, 1978)

Aescin braucht zu seiner Wirkungsentfaltung meist den Gesamtorganismus

In unseren Experimenten schützte Aescin, obwohl in einem Konzentrationspektrum von 3 Zehnerpotenzen (0.0025 %, 0.01 %, 0.1 %) an der isolierten Ohrdrandvene erprobt, jedoch nicht vor einem Proteinödem.

Vogel und Uebel (Vogel, 1960) stellten die These auf, daß Aescin indirekt wirkt und dazu das Vorhandensein des Kreislaufsystems erforderlich ist. Aescin zeigte nämlich in den Experimenten von Vogel eine Reaktion erst 16 Stunden nach seiner Verabreichung.

Vogel (1960) und Preziosi (1965) fanden heraus, daß Aescin seine Wirkung nur bei intakter Nebennierenrinde entfaltet, ohne aber aus dieser direkt Nebennierenhormone freizusetzen. Es ist vielmehr nur voll aktiv in einem Zellstoffwechsel, der unter dem Einfluß von Wirkstoffen der Nebennierenrinde steht. Die corticomimetische Aktivität des Aescin konnte insofern beobachtet werden, daß mit Aescin vorbehandelte adrenalectomierte Ratten bei Kältebelastung geringere Sterblichkeit als unbehandelte Tiere zeigten (Preziosi, 1965).

Auf welche Weise Aescin(0.0025 %ig) in vitro selektiv das Flüssigkeits-
ödem minderte, wurde oben diskutiert.

Unsere Experimente deuten also daraufhin, daß ein allgemeiner ödem-
protektiver Effekt des Aescins erst im Gesamtorganismus, möglicher-
weise erst im Zusammenhang mit der Nebenniere zum Tragen kommt. Ob
Aescin in vitro bei gleichzeitiger Applikation von Wirkstoffen der Ne-
benniere eine vermehrte Proteinpermeabilität vermindert, muß getestet
werden.

6. LITERATUR

Abé H., Sakaguchi M., Anno M., Avichi S.

Erythrocyte membrane stabilization by plant saponins and saponinins. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 316, 262-S (1981).

Annoni F., Mauri A., Marincola F., Resele L.F.,

Venentonic activity of Aescin on the human saphenous vein. Arzneim.-Forsch. 29, 672 (1979).

Barrow A., Griffiths L.A.

Metabolism of the Hydroxyethylrutosides. II. Excretion and Metabolism of 3',4',7-Tri-O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside and Related Compounds in Laboratory Animals after Parenteral Administration. Xenobiotica 1, 1-16 (1974).

Barrow A., Griffiths L.A.

Metabolism of the Hydroxyethylrutosides. III. The Fate of Orally Administered Hydroxyethylrutosides in Laboratory Animals. Metabolism by Rat Intestinal Microflora in Vitro. Xenobiotica 4, 743-754 (1974a).

Baumann J., Bruchhausen v. F., Wurm G.

A structure-activity study on the influence of phenolic compounds and bioflavonoids on rat renal prostaglandin synthetase. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, 73-78 (1979)

Beach V., Steinetz B.G.

Quantitative measurement of Evansblue space in the tissue of the rat: Influence of 5-Hydroxytryptamine antagonists and phenelzine on experimental inflammation. J. Pharmacol. 131, 400-406 (1961).

Berti F., Omini C.O., Longiave D.

The mode of action of Aescin and the release of prostaglandins.
Prostaglandins 14, 241 (1977)

Börcsök E.K., Földi I., Györi O.T., Zoltan, Földi M.

Angiologica 7, 51 (1970)

Byung Sul, In-Ho Jo

Interaction of sea cucumber saponins with multilamellar liposomes.
Chem-Biol. Interactions 52, 185-202 (1984)

Casley-Smith J.R.

The actions of the benzo-pyrones on the blood-tissue-lymphsystem. Folia Angiol. 24, 7-22 (1976).

Casley-Smith J.R., Bolton T.

Electron Microscopy of the Effects of Histamine and Thermal Injury on the Blood and Lymphatic Endothelium, and the Mesothelium of the Mouse's Diaphragm together with the Influence of Coumarin and Rutin. Experientia 29, 1386-1388 (1973).

Casley-Smith J.R., Földi-Börcsök E., Földi M.

Fine Structural Aspects of Lymphoedema in Various Tissues and the Effects of Treatment with Coumarin and Troxerutin. Brit. J. exp. Path. 55, 88-93 (1974).

Casley-Smith J.R., Földi-Börcsök E., Földi M.

A fine structural demonstration that some benzopyrones act as vitamin P in the rat. Ann. J. Clin. Nutr. 28, 1242-1254 (1975)

Casley-Smith J.R., Piller N.B.

The Pathogenesis of Oedemas and the Therapeutic Action of Coumarin and Related Compounds. *Folia Angiologica Suppl.* 3, 33-63 (1974).

Casley-Smith J.R., Window J.

Quantitative Morphological correlations of the Increased Vascular Permeability caused by Burning and Histamine, with the Effect of Benzo-Pyrones. *Microvascular Res.* (1975).

Chanal J.L., Cousse H., Sicart M.T., Bonnaud B., Marignan R.

European Journal of drug metabolism and pharmacokinetics Vol. 6, No. 3, 171-177 (1981).

Chanal J.L., Mbatchi M.T., Sicart M.T., Cousse H., Fauran F.

Traveleuse de la Société de Pharmacie de Montpellier 41 (4), 263-272 (1981a)

Estler C.-J.

Zur Pharmakologie der Bioflavonoide. *Fortschr. Med.* 89, 669-671 (1971)

Felix W.

Strömungsmessung mit Thermistoren. *Arch. exp. Path. Pharm.* 244, 254-269 (1962).

Felix W.

Über den Einfluß von O-(β -Hydroxyäthyl) rutosiden auf die Durchblutung im akuten Stauungsödem der hinteren Extremität der Katze. In: Kongreßbericht vom III. Internationalen Kongreß der Phlebologie, Amsterdam 9.-13. Sept. Ed Stenvert & Zoon, Apeldorn, Holland 529 (1968).

Felix W., Remien J., Hällfritsch K.

Zur Messung von Venenreaktionen im Tierversuch. *Pflügers Arch.* 329, 352–359 (1971).

Felix W.

Zur Wirkung von O-(β -Hydroxyethyl)rutosiden auf die Ödembildung durch Ethoxysklerol und Thiopental am Hinterlauf der Katze. In: Voelter W., Jung G. (Hrsg.) O-(β -Hydroxyethyl)rutoside—experimentelle und klinische Ergebnisse. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 93–102 (1978).

Felix W.

Pharmakotherapie bei venösen Durchblutungsstörungen. Chronische periphere Ödeme. *Ergebnisse der Angiologie* 17, 85–90 (1978a)

Felix W., Nieberle J., Schmidt G.

Wirksamkeit von O-(β -Hydroxyethyl)rutosiden bei peroraler Applikation und Unspezifität ihrer protektiven Wirkung. In: Voelter W., Jung G. (Hrsg.) O-(β -Hydroxyethyl)rutoside—neue Erkenntnisse in Experiment und Klinik. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 65–74 (1983)

Felix W., Nieberle J., Schmidt G.

Protektive Wirkung von Trimethylhesperidinchalcon und *Ruscus aculeatus* gegenüber dem Etacrynsäureödem am Hinterlauf der narkotisierten Katze. *Phlebol. u. Proktol.* 12, 209–218 (1983a).

Felix W., Schmidt G., Nieberle J.

Protective Effect of *Ruscus* extract against injury of vascular endothelium and vascular smooth muscle caused by ethacrynic acid. *Inter. Angio.* 3, 77–79 (1984)

Felix W.

Spektrum Venenmittel. Aesopus Verlag (1986).

Fischer H.

Venenleiden. Eine repräsentative Untersuchung in der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland (Tübinger Studie). München-Wien-Baltimore: Urban & Schwarzenberg. (1981)

Fischer H.

Klinik der chronischen Veneninsuffizienz. In: W. Schneider, J. Walter: Kompendium der Phlebologie. Die chronische Veneninsuffizienz in Theorie und Praxis. München: Wolf (1984)

Földi M., Casley-Smith J.R.

The role of the lymphatics and the cells in high-protein oedemas
Molec. Aspect. Med. 2, 77-146 (1978).

Förster H., Harth P.

Studies on the Absorption and Metabolism of Rutosides. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Suppl. 282, R 21 (1974)

Förster H.

Resorption und Stoffwechsel von Hydroxyethylrutosiden. In: Voel-ter W., Jung G. (Hrsg) O-(β -Hydroxyethylrutoside- experimentelle und klinische Ergebnisse. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York 43-62 (1978).

Forth W., Henschler D., Rummel W.

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (1983)

Fritz-Niggli H.

Rutoside und strahleninduzierte Tumorregression: Differenzierte Reaktionen maligner und gesunder Zellen. In Voelter W., Jung G. (Hrsg.) O-(β -Hydroxyethylrutoside – experimentelle und klinische Ergebnisse. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York 169–180 (1978).

Fritz-Niggli H.

Experimentelle Daten zur Wirkung von HR in der Radioprotektion. In: Voelter W., Jung G. (Hrsg.) O-(β -Hydroxyethylrutoside – neue Erkenntnisse in Experiment und Klinik. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York 225–235 (1983).

Gabor M.

Pharmacologic effect of flavonoids on blood vessels. Symposia Angiologica Santoriana, 4th int. Sym., Fribourg-Nyon 1972. Angiologica 9, 35–374 (223–242) (1972)

Gabor M.

Anti-inflammatory substances of plant origin. aus Handb. Exp. Pharm. 50 II, 698–739 (1979)

Gecse A., Zvilinsky E., Horpacsy G., Gabor M.

Adatok a flavonoidok gyulbadasgatlo effectusanak hatas-mechanismusakoz. Uiserl. Orvostud. 24, 41 – 45 (1972).

Geißler G.

Chromatographische Untersuchungen an vier wasserlöslichen Rutosiden. Arzneim.-Forschung, Bd. 25, 4 511–516 (1975)

Gloor M., Rother H., Friedrich H.C.

Z. Hautkr. 49, 393 (1974).

Golden G.

Eine Übersicht über neue pharmakologische Effekte und klinische Resultate von O-(β -Hydroxyethyl)rutosiden. In: Voelter W., Jung G. (Hrsg.) O-(β -Hydroxyethyl)rutoside — experimentelle und klinische Ergebnisse. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 141–153 (1978).

Gounon P.

Étude de la perméabilité capillaire dans l'évaluation objective d'un veinotonique. Phlebologie 33,3 569–574 (1980)

Griffiths L.A.

The Role of the Intestinal Microflora in Flavonoid Metabolism, Topics in Flavonoid Chemistry and Biochemistry. 4th Hungarian Bioflavonoid Symposium, (Farkas, Gabor, Kallay Eds.). Akademiai Kiado, Budapest, pp. 201–213 (1975)

Griffiths L.A., Barrow A.

The Fate of Orally and Parenterally Administered Flavonoids in the Mammals. Angiologica 9, 162–174 (1972).

Griffiths L.A., Hackett A.M.

Hepatic Clearance and Disposition of Hydroxyethylrutosides. Arch. Toxicol. Suppl. 1, 243–246 (1978).

Gross F.

Unspezifische Beeinflussung entzündlicher Reaktionen. Schweiz. med. Wschr. 80, 697–701 (1950).

Gugler R., Dengler H.J.

Inhibition of human liver Catechol-O-Methyl-transferase by flavonoids. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276, 223-233 (1973).

Hackett A.M., Griffiths L.A.

The Disposition and Metabolism of 3',4',7-Tri-O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside and 7-Mono-O-(β -Hydroxyethyl)rutoside in the Mouse. Xenobiotica 10, 641-651 (1977).

Hackett A.M., Griffiths L.A.

Enterohepatic cycling of O-(β -Hydroxyethyl)rutosides and their Biliary Metabolites in the Rat. Experientia 33, 161-162 (1977).

Hackett A.M., Griffiths L.A.

The Metabolism and Excretion of 7-Mono-O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside in the dog. Eur. J. Drug Met. and Pharmacokinetics 4, 207-212 (1979).

Hackett A.M., Griffiths L.A., Luyckx A.S., Cauwenberger van H.

Metabolism of Hydroxyethylrutosides (HR). Metabolism of (C^{14})-HR in Man. Arzneimittel-Forschung (Drug Res.) 26, 925-928 (1976).

Hammersen F.

The fine structure of different types of experimental edemas for testing the effect of vasoactive drugs demonstrated with a flavonoid. In Canél M., Laszt L. (Ed.) : Clinical Pharmacology: Flavonoids and vascular wall. Symposia angiologica santoriana. 4th International Symposium, Fribourg-Nyon 1972, 194-222. Basel-München-Paris-London-New York-Sydney : Karger (1972).

Hammersen F.

Zur Ultrastruktur experimenteller Ödeme und deren Beeinflussung durch O-(β -Hydroxyethyl)rutoside. In: Voelter W., Jung G. (Hrsg.) O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside—experimentelle und klinische Ergebnisse. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 181–189 (1978)

Hammersen F., Fischer H., Bräuer H.

Blutfluß, Venen und Ödeme. Müller & Steinicke, München (1985).

Hammersen F., Hammersen E.

Zur Ultrastruktur des durch Etacrynsäure oder Polidocanol hervorgerufenen Ödems und seine Beeinflussung durch O-(β -Hydroxyethyl)rutoside. In : Voelter W., Jung G. (Hrsg.) O-(β -Hydroxyethyl)rutoside—neue Erkenntnisse in Experiment und Klinik. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York (1983).

Hammersen F., Möhring E.

Der Feinbau der Endstrombahn beim Dextran-Ödem und deren Beeinflussung durch HR. Fortschr. Med. 86, 925–927 (1968).

Hammersen F., Möhring E.

Das Dextran-Ödem der Ratte als morphologisches Modell zur Prüfung gefäßaktiver Pharmaka. Dtsch. med. Wschr. 21, 472–478 (1970).

Hammersen F., Möhring E.

Zum Feinbau enzymatisch bedingter Endothel- und Erythrozytenveränderungen (Phospholipase-Ödem) und deren Beeinflussung durch HR. Dtsch. med. Wschr. 23, 406–409 (1972)

Hammersen F., Thiel H.-J., Sauer R.

The Beneficial Effect of O-(β -Hydroxyethyl)rutoside on Radiation-Induces Edema in the Rat. in Felix (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)rutoside. Neue Ergebnisse aus Klinik und Forschung (1987).

Harper H.A., Löffler G., Petrides P.E., Weiss L.

Physiologische Chemie. Springer-Verlag. 764-765 (1975)

Heppner F., Ascher P., Argyropoulos G.

Wien. med. Wschr. 117,706 (1967).

Jung G., Ottnand M., Voelter W.

Quantitative Determination of O-(β -Hydroxyethyl)-rutosides in human blood after intravenous and oral administration by circular dichroism. Europ. J. of Drug Metabolism and Pharmacokinetics 3, 131-141 (1977).

Kato L., Gözsy L.

Effets vasculaires des bioflavonoides chez le rat. Vie m'ed. 50, 33-42 (1969).

Klemm J.

Besitzt O-(β -Hydroxyethyl)-rutosid einen protektiven Effekt im bestrahlten und unbestrahlten Gewebe? Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20,817-821 (1970).

Klemm J.

Venoruton und periphere Durchblutung (tierexperimentell und klinisch im rheologischen Bereich). In: Voelter W., Jung G. (Hrsg.) O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside-experimentelle und klinische Ergebnisse. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 191-197 (1978).

Klemm J.

Venöse Erkrankungen: Erfolgversprechende Therapie mit Kombinationspräparaten. Diagnostik 14, 392–396 (1981).

Lande de la, I.S., Rand M.J.

A simple isolated nerve– blood vessel preparation. J. exp. Biol. Sci. 43, 639–659 (1965).

Lande de la, I.S., Viktoria A., Canell A., Watson J.G.

The interaction of Serotonine and Noradrenaline in the perfused artery. Br. J. Pharmac. Chemoth. 28, 255–272 (1966).

Lang W., Mennicke H.

Pharmakologische Untersuchungen mit tritiiertem Aescin an Maus und Ratte. Arzneim.-Forsch. 22, 1928 (1972).

Layer H.

Vergleichende Untersuchungen über die Schutzwirkung von O-(β -Hydroxyethyl)rutosiden und Troxerutin an der Vena auricularis des Schweines. (1988)

Lecomte J. , Cauwenberge H.

Sur quelques propriétés pharmacologiques du mono (O- β -Hydroxyethyl)-7-Rutose chez le rat. Arch. Int. Pharmacodyn. 208, 317– 327 (1974).

Lecomte J., Cauwenberge v. H., Lallemand G.

Sur l'oedeme généralisé provoqué par les rutosides chez le rat. C.R. Soc. Biol. 165, 2462–2464 (1971).

Leu H., Rüttner J., Vogel A., Grieshaber E.

Das Studium der Kapillaren am peritonealen Fremdkörpergranulom
(Ein neuer Modellversuch zum Studium vasoaktiver Substanzen).
Zbl. Phlebol. 7,60-71 (1968).

Longiave D., Omini C., Nicosia S., Berti F.

The mode of action of Aescin on isolated veins. Relationship with
PGF₂. Pharmacological Research Communication Vol. 10, Nr.2, 145
(1978).

Lorenz D., Marek M.L.

Das therapeutisch wirksame Prinzip der Roßkastanie (*Aesculus
hippocastaneum*). 1. Mitt.: Aufklärung des Wirkstoffes. Arzneimit-
tel-Forsch. 10, 263-272 (1960).

Lorenz W., Kusche J., Barth H., Mathias Ch.

Action of several flavonoids on enzymes of histamine metabolism
in vitro. In: Histamine. Mechanisms of Regulation of the Biogenic
Amine Level in the Tissues with Special Reference to Histamine.
Proceedings of Satellite Symposium of the XXVth International
Congress of Physiological Sciences. Lodź, Poland 1971, Maslinski,
C. (Ed.), 265-269, Stroudsburg, Penn :Dowden, Hutchinson & Ross
Inc. (1973).

Lund F., Fagrell B., Kinichi J., Glenne P.O.

The effect of O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside in post-ischaemic
and stasis oedema of the rat tail. In III. International Congress of
Phlebology, Amsterdam 9.-13.4. 1968 Congress Volumes 111, 166-179
(1970).

Manuel M.A., Weiner M.W.

Effects of ethacrynic acid and furosemide on phosphorylation reactions of kidney mitochondria inhibition of the adenine nucleotide translocase. *Biochim. Biophys. Acta* 460,445-454 (1977).

Mikrovitch V., Robinson J.W.L., Bel F., Gumma H.

Vergleichende Untersuchung am Hund zur Pharmakokinetik zweier Darreichungsformen mit der Wirksubstanz O-(β -Hydroxyethyl)rutosiden. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 23, Nr.7, 967-969 (1973).

Müller V.

Einfluß verschiedener vegetativer Blocker auf die Interaktion zwischen Adrenalin und Serotonin an der isolierten Ohrrendvene des Schweines. *Dissertation.* (1988)

Neu R.

Naturwissenschaften 44, 181 (1957)

Obermayr M.-M.

Protektive Wirkung von Trimethyl-Hesperidin-Chalcon und Ruscus-Aculeatus auf die durch Etacrynsäure geschädigte glatte Muskulatur der isolierten Pfortader der Ratte. *Dissertation* (1982).

Ochsenkühn A.

Interaktion zwischen Adrenalin und Serotonin an der isolierten Ohrrendvene des Schweines. *Dissertation* (1988)

Piller N.B.

The Resolution of Thermal Oedemas at Various Temperatures under Coumarin Treatment. *Brit. J. exp. Path.* 56, 83-91. (1975)

Piller N.B.

Benzopyrone treatment of mild thermal oedema: determination of the most effective doses. *Arzneim.-Forsch.* 27, 1138–1141 (1977).

Piller N. B., Casley-Smith J.R.

The Effect of Coumarin on Protein and PVP Clearance from Rat Legs with Various High Protein Oedemas. *Blood Vessels* (1975).

Prérovsky J., Hladovec J.

Suppression of the Desquimating Effect of Smoking on the Human Endothelium by Hydroxyethylrutosides. *Bloodvessels* 16, 239–240 (1979).

Ring K., Valenteijn A., Haardt U., Henkel B., Hennings G., Wurm G. Membranen als Zielsysteme von Flavonoiden: Der Einfluß von Quercetin und Quercetinderivaten auf die Permeabilität künstlicher Lecithinmembranen. In: Voelter W., Jung G. (Hrsg.) O-(β -Hydroxyethyl)rutoside—neue Ergebnisse aus Experiment und Klinik. Springer-Verlag Berlin 55–64 (1983).

Rothkopf M., Vogel G.

Neue Befunde zur Wirksamkeit und zum Wirkungsmechanismus des Roßkastaniensaponins Aescin. *Arzneim.-Forsch.* 26, 225 (1976).

Róztocil K., Prérovsky I., Oliva J.

The Effect of Hydroxyethylrutosides on Capillary Filtration Rate in the Lower Limb of Man. *Europ. J. clin. Pharmacol.* 11, 435–438 (1977).

Schneider E., Felix W.

Responses of isolated porcine ear veins to acetylcholine (ACh).
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 330, Suppl. R 57 (1985).

Schwabe K.-P., Flohe L.

Catechol-O-Methyltransferase, III.

Beziehungen zwischen der Struktur von Flavonoiden und deren Eignung als Inhibitoren der Catechol-O-Methyltransferase. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 476—482 (1972).

Seidenberger A.V., Müller J., Heindl H.J.H.

Ein neues Venentherapeutikum. Therapiewoche 24, 867—881 (1974).

Seydewitz V., Staubesand J.

Zur Strukturanalyse der sog. Venenwandschwäche. aus: Chronische Veneninsuffizienz. Pathogenese und medikamentöse Therapie. Ergebnisse der Angiologie. Band 30. Fischer H. (Hrsg.)
Schattauer Verlag. Stuttgart. New York (1984).

Siering H.

Die Permeabilität von Zielmembranen für Ionen unter dem Einfluß von Aescin. Arzneim.-Forsch. 12, 376 (1962).

Spector W.G., Willoughby D.A.

Suppression of increased capillary permeability in injury by monoamine oxidase inhibitors. Nature 186, 162—163 (1960).

Tarayre J.P., Laouressergues

Preuves Pharmacologiques De L'Activité de l'Hesperidine Methyl Chalcone. Extrait de la revue Angiologique 4, 197—203 (1975).

Tarayre J.P., Laouressergues

Advantages of a combination of proteolytic enzymes, flavonoids and ascorbic acid in comparison with non-steroid anti-inflammatory agents. *Arzneim.-Forsch.* 22 (I), 1144-1149 (1977)

Thulesius O., Chairman Ph.D.

Present and future role of vasoactive drugs in peripheral vascular disease. aus: *Proceedings of the international Symposium Vein and Microcirculation*, Athen 1983. *Inter. Angio. Suppl.* 3. Vol. 2 (1983)

Vogel G., Uebel H.

Das therapeutisch wirksame Prinzip der Roßkastanie (*Aesculus hippocastan*)
Arzneim.-Forsch. 10, 275-280 (1960).

Wagner H.

Pharmazeutische Biologie 2. Drogen und ihre Inhaltsstoffe.
Gustav-Fischer-Verlag (1984).

Wagner H., Bladt S., Zgainski E.M.

Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen.
Springer (1983).

Weinstein G.D.

aus: Swine in biochemical research. *Proceedings of a Symposium at the Pacific Northwest Laboratory, Richland, Washington. July 19-22, (1965).*

Wilhelm K., Feldmeier Ch.

Med. Klin. 72, 128 (1977).

Wurst F., Reinartz G., Kärcher K.-H.

Die strahlenschützende Wirkung von Venoruton^R, gemessen an Hydroxyprolin als biochemischer Parameter des radiogenen Effektes an der Bindegewebsubstanz, erste Mitteilung. In: Voelter W., Jung G. (Hrsg.) O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside - experimentelle und klinische Ergebnisse. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 181-189 (1978).

Yanase M., Ovita Y., Fukukawa N., Okada A.

Effect of Ethacrynic acid on mitochondrial electron transport system and oxidative phosphorylation. *Arzneim.-Forsch.* 33, 120-124 (1983).

7. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. W. Felix danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Cleve danke ich sehr für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Schneider für die Anleitung und Unterstützung bei dieser Arbeit, sowie Frau Stelgerwald und Frau Schubert für ihre stets gewährte Hilfe bei allen technischen Problemen.

Bei Herrn Michael Jarnach und Herrn Hans Layer bedanke ich mich herzlich für die kollegiale Zusammenarbeit bei der Durchführung der Katzenexperimente.

